

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
MENTION : SCIENCES

PAR

Lucien Penasse

1^{ère} THÈSE. — MÉTHODE POUR LA DÉTERMINATION DES RADICAUX
CARBOXYLIQUES DANS LES PROTÉINES.
APPLICATION A L'INSULINE ET A L'OVOMUCOÏDE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 30 Avril 1952 devant la Commission d'examen.

MM. PRÉVOST

Président.

WURMSER

FROMAGEOT

} Examineurs.

FACULTE DES SCIENCES

Nom du Candidat : PENASSE.

Prénom : LUCIEN.

Date de la soutenance : 30 AVRIL 1952.

Numéro d'ordre : SERIE A.558 - N° 582.

PENASSE (Lucien).-

Méthode pour la détermination des radicaux carboxyliques dans les protéines.
- Imprimé à Bruxelles, 1952.
In-4°, 40 p. fig.

Th.Sc.Doct.Univ.Paris 1952.
Ser.A.558.N° 582.

PENASSE (Lucien).-

Méthode pour la détermination des radicaux carboxyliques dans les protéines.
- Imprimé à Bruxelles, 1952.
In-4°, 40 p. fig.

Th.Sc.Doct.Univ.Paris 1952.
Ser.A.558. N° 582.

PENASSE (Lucien).-

Méthode pour la détermination des radicaux carboxyliques dans les protéines.
- Imprimé à Bruxelles, 1952.
In-4°, 40 p. fig.

Th.Sc.Doct.Univ.Paris 1952.
Ser.A.558. N° 582.

PENASSE (Lucien).-

Méthode pour la détermination des radicaux carboxyliques dans les protéines.
- Imprimé à Bruxelles, 1952.
In-4°, 40 p. fig.

Th.Sc.Doct.Univ.Paris 1952.
Ser.A.558. N° 582.

PENASSE (Lucien).-

Méthode pour la détermination des radicaux carboxyliques dans les protéines.
- Imprimé à Bruxelles, 1952.
In-4°, 40 p. fig.

Th.Sc.Doct.Univ.Paris 1952.
Ser.A.558. N° 582.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
MENTION : SCIENCES

PAR

Lucien Penasse

1^{ère} THÈSE. — MÉTHODE POUR LA DÉTERMINATION DES RADICAUX
CARBOXYLIQUES DANS LES PROTÉINES.
APPLICATION A L'INSULINE ET A L'OVOMUCOÏDE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 30 Avril 1952 devant la Commission d'examen.

MM. PRÉVOST

Président.

WURMSER

FROMAGEOT

}
Examineurs.



FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS.

Doyen M. A. CHATELET.

PROFESSEURS.

G. JULIAT Analyse supérieure et Algèbre
supérieure.

A. DENJOYT Théorie des Fonctions.

L. LUTAUDT. Géographie physique et Géologie
dynamique.

E. DARMOIST Enseignement de Physique.

Robert LEVYT Physiologie comparée.

Mme RAMART-LUCAST Chimie organique.

FOCHT Mécanique physique et
expérimentale.

PAUTHENIERT Electrotechnique générale.

DE BROGLIET Théories physiques.

JOB.....T Chimie générale.

PRENANTT Anatomie et Histologie comparées.

COMBEST Physiologie végétale.

GARNIERT Géométrie supérieure.

PEREST Mécanique des fluides et applications.

LAUGIERT Physiologie générale.

TOUSSAINTT Technique Aéronautique.

M. CURIET Physique (P.C.B.).

G. RIBAUDT Hautes températures.

CHAZYT Mécanique analytique et Mécanique
céleste.

CROZET Physique théorique et physique
céleste.

DUPONTT Théories chimiques.

VALIRONT Calcul différentiel et Calcul
intégral.

BARRABET Géologie structurale et géologie
appliquée.

VAVONT Analyse et mesures chimiques.

G. DARMOIST Calcul des probabilités et Physique
mathématique.

Jacques BOURCARTT Géographie physique et Géologie
dynamique.

AUBELT Chimie biologique.

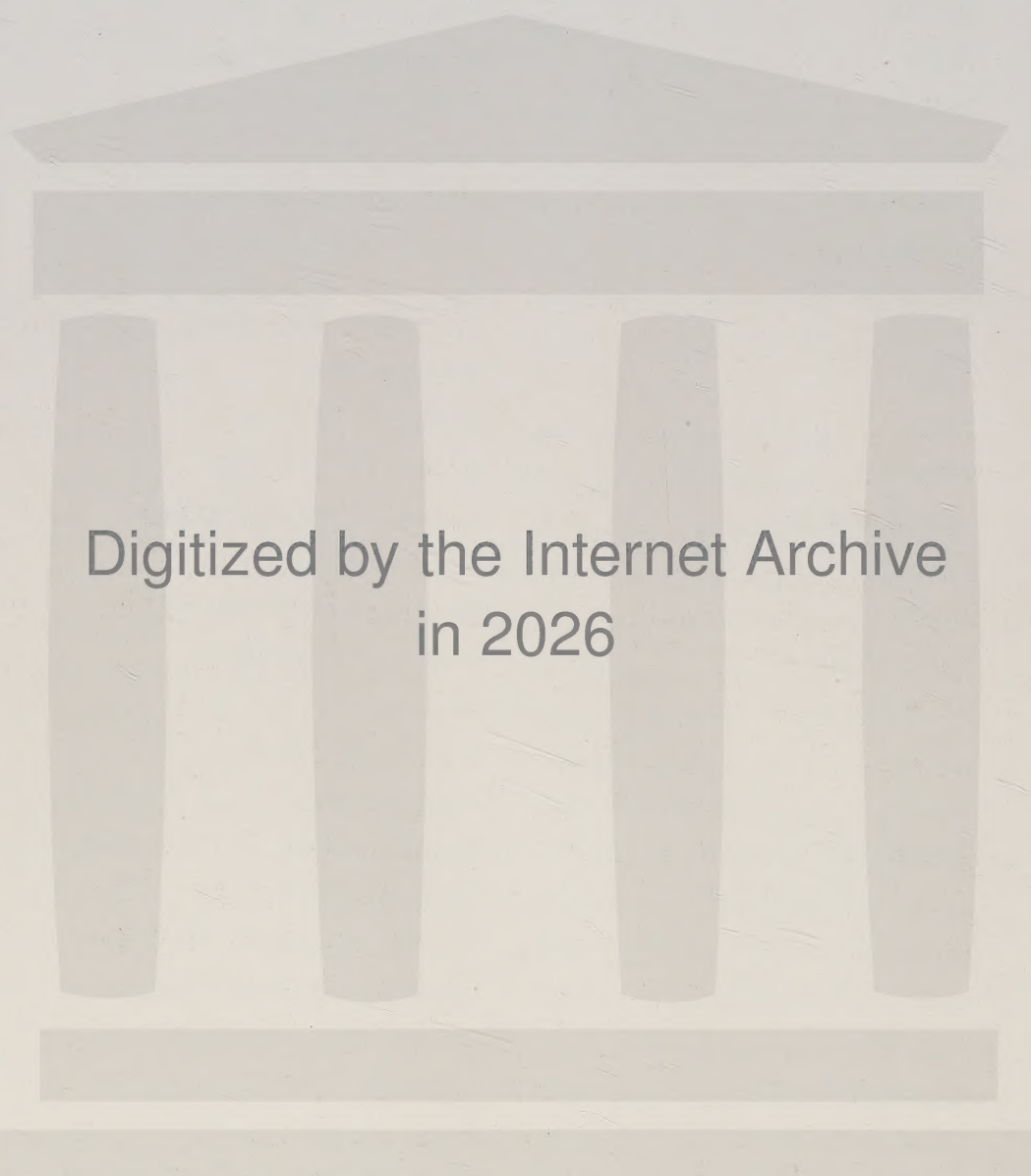
Mme JOLIOT-CURIET Physique générale et Radioactivité.

PLANTEFOLT Botanique.

CABANNES	T Recherches physiques.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T Chimie organique.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.
WYART	T Minéralogie.
TEISSIER	T Zoologie.
MANGENOT	T Biologie végétale.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.
MONNIER	Physiologie générale.
PIVETEAU	T Géologie.
ROCARD	T Physique.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.Supérieure).
SCHAEFFER	T Physiologie des fonctions.
LAFFITTE	T Chimie générale.
FAVARD	T Mécanique générale.
COULOMB	T Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).
CHRETIEN	T Chimie minérale.
P. DRACH	T Zoologie.
KASTLER	T Physique.
CHATELET	T Arithmétique et théorie des nombres.
EPHRUSSI	T Génétique.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.
BAUER	T Chimie - Physique.
RIVIERE	Géologie (P.C.B.).
GAUTHERET	T Biologie Végétale (P.C.B.).
LUCAS	T Physique.
A. THOMAS	T Evolution des êtres organisés.
ARNULF	Optique appliquée.
MAX MORAND	Physique.
SOLEILLET	Physique.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T Astronomie.
FROMAGEOT	T Chimie Biologique.
LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité.
JANET	T Mathématiques générales.
PETIT	T Biologie maritime.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.

GALLIEN	T Biologie animale (P.C.B.).
EICHHORN	Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC	Biologie végétale (P.C.B.).
Mlle CAUCHOIS	T Chimie-Physique.
THELLIER	Physique du Globe.
AUDUBERT	Electrochimie.
L'HERITIER	Génétique.
GRIVET	T Radio Electricité.
PONCIN	Mécanique des fluides.
THIRY	T Mécanique appliquée.
DUBREIL	Mathématiques générales.
QUELET	Chimie (P.C.B.).
CAGNIARD	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	Chimie appliquée.
CUVILLIER	Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T Pétrographie.
TRILLAT	Physique (P.C.B.).
WIEMANN	Chimie (P.C.B.).
LICHNEROWICZ	Mathématiques générales.
JACQUINOT	T Physique (P.C.B.).
VASSY	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	Théories physiques.
M. PRUVOST	T Géologie.
AMIEL	Chimie (P.C.B.).
HOCART	Minéralogie.
MACHEBOEUF	Microbiologie.
J.-P. MATHIEU	Physique (P.C.B.).
COUTEAUX	Biologie animale (P.C.B.).
MAY	Biologie animale (P.C.B.).
CHOQUET	Calcul différentiel.
FELDMANN	Biologie (P.C.B.).
GUINIER	Physique (P.C.B.).
JOST	Biologie (P.C.B.).

Secrétaire : Ch. MONIER.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552216_0042

INTRODUCTION.

En chimie biologique, à l'heure actuelle, l'un des problèmes principaux est celui de la structure des protéines. On peut distinguer dans l'étude de ce problème deux phases séparées :

Dans la première on détermine la constitution globale de la protéine en ses composants - principalement les acides aminés - tout comme on détermine la formule brute en Chimie organique.

Dans la seconde, on s'attache à préciser dans quel ordre et suivant quel plan ces éléments constituants sont assemblés pour former la protéine et lui donner toutes ses propriétés. Cette seconde phase commence à recevoir un début de solution. Pour cela on peut demander des renseignements aux produits de l'hydrolyse partielle de la protéine, ceux-ci étant des peptiques plus simples, on peut espérer en déterminer plus aisément la structure, puis assemblant les données ainsi acquises, en inférer tout ou partie de celle de la protéine de départ.

Une autre méthode consiste à s'adresser dans la molécule intacte aux radicaux particuliers qu'elle possède et à tenter de déterminer leurs positions respectives.

Parmi ces radicaux particuliers il en est principalement deux groupes essentiels : la protéine pouvant en première approximation être comparée à un enchainement polypeptidique, doit normalement posséder deux extrémités libres : un commencement aminé, une terminaison carboxylique. D'une façon plus précise, remarquons que la protéine peut être formée de plusieurs chaînes peptidiques et posséder donc deux ou plusieurs extrémités de chaque espèce. Enfin il se pourrait de même, ces extrémités venant se souder l'une à l'autre en formant un cycle fermé, que la protéine ne possédât plus d'extrémités libres.

Quoi qu'il en soit, l'importance primordiale de ces bouts de chaîne apparaît immédiatement : non seulement pour la connaissance de la structure de la protéine, mais encore pour la caractérisation de diverses protéines appartenant à un même groupe (les hémoglobines par exemple), pour l'étude de leurs propriétés sérologiques, et enfin, comme points d'appui dans la détermination ultérieure de l'ordre d'enchainement des amino-acides.

On possède actuellement plusieurs méthodes, dont une excellente due à Sanger (1) pour déterminer la présence, la nature et le nombre des têtes de chaînes aminées (en abrégé : terminaison N) ; l'application a pu en être faite avec un succès complet à plusieurs protéines différentes. Mais il n'est pas exagéré de dire qu'il n'existait encore récemment aucune méthode pleinement satisfaisante pour la détermination du ou des acides aminés porteurs des radicaux carboxyliques libres (en abrégé : terminaison C).

En effet, en 1949, dans une étude d'ensemble sur la structure des protéines, Desnuelle pouvait écrire (2) : "Malheureusement les extrémités carboxyliques échappent encore à toute investigation. Il faut le regretter et espérer que, dans un proche avenir, ce vide soit comblé". Sans doute avait-on pu résoudre ce problème dans quelques rares cas, mais ce n'était là que des résultats isolés, nécessitant, à chaque fois, pour être obtenus, une étude particulière. Il nous a semblé que ce problème demandait une solution générale et efficace, c'est pourquoi nous présentons aujourd'hui une méthode pour la recherche et l'identification des radicaux carboxyliques libres dans les protéines.

Principe de la méthode :

Le problème qui se pose à nous est le suivant : préparer au sein même de la molécule de protéine un dérivé de ses fonctions carboxyliques libres, hydrolyser la protéine, séparer le dérivé particulier de l'ensemble des amino-acides, et le caractérisant, en inférer la nature à l'acide terminal qui lui a donné naissance. Il importe donc que le dérivé satisfasse à un certain nombre de conditions :

- 1) pouvoir être préparé dans la molécule protéique sans trop altérer celle-ci d'autre part.
- 2) pouvoir se former également bien à partir de chacun des amino-acides naturels.
- 3) être stable à l'hydrolyse.
- 4) être séparable sans trop de difficulté du reste des amino-acides.
- 5) pouvoir être identifié par une microméthode et dosé quantitativement.

Si l'on considère d'une façon générale les propriétés de la fonction carboxylique telles qu'elles sont décrites par la chimie organique, on constate aussitôt que cette fonction donne peu de dérivés répondant à ces exigences.

La méthode qui a retenu notre attention est la réduction de la fonction acide en fonction alcool primaire. A cet effet nous nous sommes basés sur les travaux de Nystrom et Brown (4-6) qui, par réduction de certains acides organiques au moyen de l'hydrure double de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) ont pu obtenir les alcools correspondants. Nous avons étendu ce mode de réduction aux protéines. L'identification des amino-alcools primaires ainsi obtenus se fait, après hydrolyse de la protéine traitée et isolement, par chromatographie sur papier; leur détermination quantitative par dosage au moyen de l'acide périodique.

L'exposé de notre travail présente trois parties :

- 1° - Une rapide revue des travaux antérieurs dans ce domaine.
 - 2° - La réduction des acides aminés, l'obtention des alcools aminés correspondants et leur étude, en particulier au point de vue de la chromatographie.
 - 3° - L'application aux protéines : Insuline, Ovomucoïde.
-

Première Partie.

Historique des travaux antérieurs.

Le problème est ancien : dès que l'on eut reconnu dans la protéine un enchainement de nature polypeptidique, des auteurs proposèrent des méthodes destinées à identifier celui des acides aminés se trouvant en bout de chaîne. On peut distinguer parmi celles-ci des méthodes enzymatiques, physiques et chimiques. Une revue de ces méthodes a été publiée en 1945 par Fox (7).

A. Méthodes enzymatiques -

En principe, un enzyme protéolytique capable de décrocher l'acide terminal et lui seul, serait l'instrument idéal pour résoudre notre problème. Il faut reconnaître toutefois que les données acquises dans ce domaine sont entachées de causes d'erreur trop considérables pour accorder à la méthode une entière confiance. Il n'est, à cet égard, que de songer à la difficulté d'obtention d'une préparation enzymatique pure, une objection d'aussi grand poids est la possibilité de resynthèse.

Néanmoins, la méthode a rendu d'utiles services : il a été possible d'obtenir des données valables quant aux amino-acides terminaux du glutathion et des protamines. On a ainsi démontré par l'action de la carboxypeptidase que la glycine est terminale dans le glutathion (8) et que l'arginine occupe cette place dans la clupéine et la salmine (9).

Ultérieurement, Lens (10) a utilisé la carboxypeptidase dans le but de déterminer ces mêmes groupes dans l'insuline. Nous reviendrons plus tard sur ce travail; notons seulement ici que dans cette expérience, la carboxypeptidase de pancréas provoque une protéolyse de l'insuline. Cette hydrolyse est suivie par le dosage de l'azote aminé et libère 3 radicaux en 4 heures. Les produits ainsi détachés sont isolés par ultrafiltration et la chromatographie sur papier y décèle uniquement de l'alanine.

Enfin tout récemment, Thompson (119) a appliqué l'hydrolyse par carboxypeptidase au lysozyme et a isolé, dans les premiers produits libérés, la leucine, qui constituerait donc l'acide C-terminal de cette protéine.

B. Méthodes physico-chimiques -

On retiendra ensuite quelques méthodes physico-chimiques; Dakin déjà en 1913 (12) avait proposé une méthode basée sur la racémisation sous l'effet d'alcalis, qui pour un même amino-acide serait plus ou moins rapide suivant sa position en bout de chaîne ou au sein de celle-ci. Cette méthode a été reprise plus tard par Cahill et Burton (13).

L'étude des courbes de titration qui a pu être utile dans le cas du glutathion ne semble pas devoir apporter beaucoup de renseignements pour des enchainements plus complexes, ni même dans le cas de peptides moins singuliers que le glutathion (14-16).

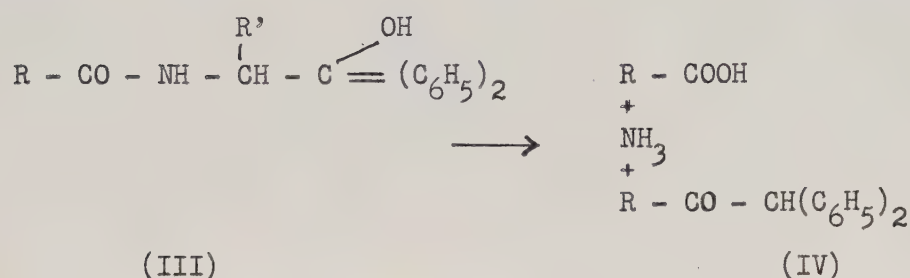
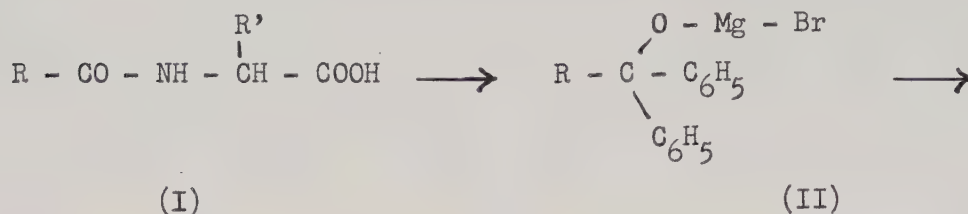
C. Méthodes chimiques -

Dès d'abord, les méthodes chimiques consistant à fixer un réactif sur le groupe libre en vue de l'identification après hydrolyse de la chaîne peptidique, semblent les plus intéressantes. Et dans cet ordre d'idées, en effet on a proposé un certain nombre de réactifs que nous passerons rapidement en revue.

(a) Réactif de Grignard :

Bettzieche (17) fait agir le réactif de Grignard, bromure de phényle (ou de benzyle) magnésium, sur un peptide estérifié : il se forme un produit de condensation diphenylé et plusieurs produits secondaires qui sont éliminés par lavage à l'éther.

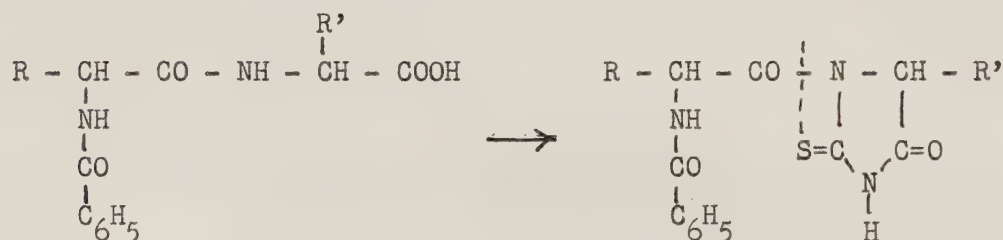
Le produit de condensation III est hydrolysé



et donne après extraction une diphenylcétone caractéristique de l'acide de départ.

(b) Thiohydantoïne, Schlack et Kumpf (18) :

Dans cette méthode on chauffe le peptide benzoylé en présence d'anhydride acétique et d'isocyanate d'ammonium, il se forme la thiohydantoïne au radical carboxylique.



et après hydrolyse alcaline on peut isoler par cristallisation la thiohydantoïne caractéristique de l'acide de départ. Il est indispensable de protéger le radical aminé par benzylation, sans quoi il se formerait à son niveau un complexe avec l'isocyanate.

La principale objection à cette méthode est qu'elle donne en général un grand nombre de produits secondaires mal définis. Cette difficulté, surmontable dans le cas de peptides simples, devient rédhibitoire dans le cas de peptides plus complexes et de protéines.

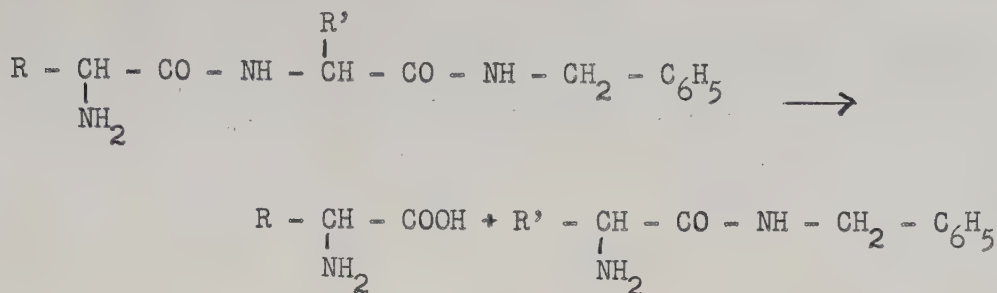
Récemment, Tibbs (19) a repris cette méthode en la faisant bénéficier des procédés actuels de chromatographie sur papier. Même sous cette forme, elle n'a pu être appliquée avec succès qu'à des peptides.

Il est à remarquer qu'une variante de cette méthode a eu beaucoup plus de succès auprès des radicaux aminés libres.

(c) Benzylamine, Abderhalden et Brockmann (20) :

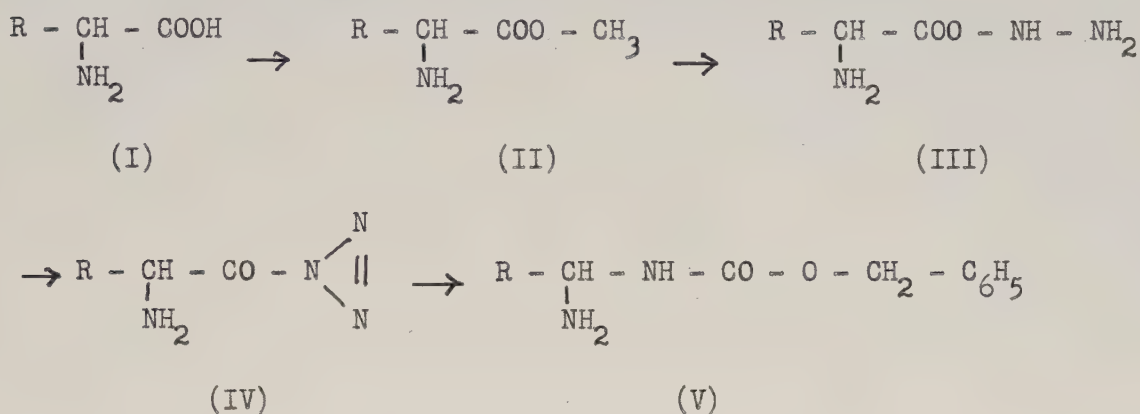
Ici le peptide estérifié est chauffé dans de la benzylamine qui se fixe sur les radicaux carboxyliques. Il suffit ensuite de procéder à l'hydrolyse du produit traité pour obtenir, entre autre un acide aminé benzylé, dérivé relativement stable à l'hydrolyse acide.

La méthode nécessite une quantité considérable de produit et n'a pû de ce fait être appliquée qu'à des peptides simples comme la leucylglycine et l'alanyl-glycyl-leucine.



(d) Méthode de Bergmann et Zervas (21, 22) :

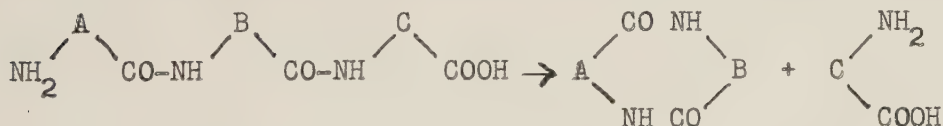
Le peptide estérifié (II) est transformé successivement en hydrazide (III) puis en azide (IV), enfin en uréthane (V). L'hydrogénation catalytique sur Pd de ce dernier dérivé donne entre autre l'aldéhyde avec un C en moins que l'amino-acide de départ.



Le procédé toutefois est fort complexe, son rendement ne dépasse pas 10 %, aussi n'a-t-il pû être appliqué qu'à un tétrapeptide de synthèse : l'acide glycyl-alanyl-leucyl-glutamique.

(e) Méthode au β -naphtol (23) :

Cette méthode est basée sur le fait que le chauffage des peptides en présence de β -naphtol provoque des réactions de cyclisation. Dans le cas de dipeptides il y a simple formation de dicétopipérazine, mais s'il s'agit d'un tripeptide, cette réaction peut servir à l'identification de l'amino-acide à groupe carboxylique libre. En effet, lui seul est détaché alors que les deux autres se cyclisent; ce qui peut s'écrire schématiquement :



Il suffit, après la réaction et lavage à l'éther, de sécher le produit et de l'extraire au chloroforme qui dissout la dicétopipérazine et laisse l'amino-acide.

Dans le cas de tétrapeptide il se forme vraisemblablement deux cycles de dicétopipérazine.

La méthode ne présente donc quelque intérêt que dans le cas de tripeptides. Encore faut-il tenir compte du fait que le chauffage en présence de β -naphtol est une réaction brutale et totalement destructrice de certains amino-acides.

De cette rapide énumération on peut conclure que les méthodes

chimiques déjà existantes seraient sans doute applicables sans trop de difficulté aux di- et tripeptides, mais il faut reconnaître qu'aucune d'entre elles n'a reçu, même dans ce domaine restreint, plus d'une ou deux applications. De plus si l'on s'adresse aux molécules protéiques elles-mêmes, aucune de ces méthodes n'a pu être utilisée. Tantôt le dérivé est trop fragile pour être retrouvé après l'hydrolyse de la protéine, tantôt le réactif lui-même est infiniment trop brutal pour respecter une structure aussi aisément altérable qu'une protéine.

Deuxième Partie.

Les Amino-Alcools.

Notre méthode étant basée sur la formation d'amino-alcools au sein de la molécule protéique, il importait d'être en possession de chacun des amino-alcools correspondant aux acides aminés naturels pour identifier ceux-ci.

Sauf la colamine fournie par le commerce, nous avons synthétisé les amino-alcools primaires par réduction des esters éthyliques ou méthyliques des acides aminés par l'hydrure double de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) selon la technique de Karrer, Portman et Suter (24) pour alaninol, sérinol, thréoninol, valinol, leucinol, isoleucinol, prolinol, lysinol, phénylalaninol, tyrosinol, aspartidiol et glutamidiol; de Karrer, Suter et Waser (25) pour histidinol; de Karrer et Portman (26) pour tryptophanol. Thréoninol, valinol, lysinol, et isoleucinol n'avaient pas encore été obtenus par cette voie.

Nous décrirons ici, successivement, la préparation, les propriétés, l'isolement, la caractérisation et le dosage des amino-alcools.

1° - Préparation des amino-alcools.

Nous avons été conduits à reprendre l'étude de chaque étape de cette préparation et nous y avons apporté de nombreuses modifications. Nous donnerons ici la description du mode d'obtention; d'une façon générale celui-ci est le même pour tous les amino-alcools. Nous consignerons ensuite quelques observations sur chacun de ceux-ci.

Anciennement déjà, Karrer (27-29) avait tenté la préparation d'amino-alcools par réduction d'amino-acides au moyen de sodium et d'éthanol (méthode de Bouveault et Blanc). Il espérait par cette voie transformer les amino-acides naturels résultant d'un hydrolysât protéique en les alcools correspondants, séparables par distillation fractionnée. On sait toutefois que ce mode de réduction est fort brutal et provoque une notable désamination du produit de départ. Quoi qu'il en soit Karrer avait pu obtenir de cette façon alaninol, leucinol et phénylalaninol.

A. Théorie de la réduction :

L'introduction par Schlesinger et CoLL. (3) des hydrures métalliques doubles comme réducteurs en chimie, a permis à Karrer de reprendre cette préparation avec plus de succès en opérant sur les esters des amino-acides.

On sait en effet la large place que ces réducteurs n'ont pas tardé d'acquiescer grâce à leurs remarquables propriétés. L'une de celles-ci et non la moindre est leur grande spécificité d'action, qui peut se résumer par ce principe. L'hydrure double de Li et d'Al réduit presque exclusivement les doubles liaisons entre atomes différents ($>\text{C}=\text{O}$; $>\text{C}=\text{N}-$; $\text{O}=\text{N}=\text{O}$) et respecte entièrement la double liaison éthylénique ($>\text{C}=\text{C}<$) et le noyau benzénique, ainsi que la liaison halogène-carbone.

De plus, mais ceci est plutôt dû à leur caractère métallique, ils provoquent le départ des H mobiles (alcools, amines) avec formation d'un sel double de Li et d'Al; bien qu'il ne s'agisse pas là d'une réduction, il faudra tenir compte de cette réaction dans le calcul de la quantité d'hydrure nécessaire.

Un autre avantage de l'emploi de LiAlH_4 réside dans le fait que, dans presque tous les cas, déjà nombreux, décrits par la littérature, la

réaction se fait avec un bon rendement et ne conduit pratiquement à aucun produit secondaire comme les autres modes de réduction le font souvent.

Cette spécificité toute particulière a conduit divers auteurs à formuler des théories du mode d'action des hydrures doubles; aucune à ce jour n'est cependant pleinement satisfaisante (32,33).

On remarque en particulier que les radicaux les plus réductibles possèdent le caractère électronégatif; cette spécificité ne permet donc pas de considérer l'hydrure double comme un simple donneur d'hydrogène, car alors la réduction ne se limiterait pas à quelques fonctions. Ceci porte à croire que la réaction a un caractère polaire, quelques auteurs supposent même ionique.

Des revues ont été publiées par Solms (30) et par Brown (31).

Parmi les fonctions réductibles par l'hydrure et répondant à ces principes, figurent les radicaux carboxyliques et surtout leurs esters qui sont les plus aisément transformés.

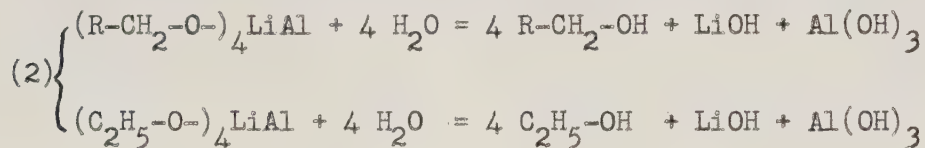
L'hydrure double de Li et d'Al n'est soluble que dans quelques solvants anhydres dépourvus de caractère hydrophile et n'ayant aucun hydrogène mobile. Les amino-acides naturels étant insolubles dans ces milieux, on opérera la réduction sur leurs esters méthyliques ou éthyliques, ceux-ci sont en effet solubles dans l'éther.

La réduction de la fonction ester en alcool se fait par les réactions suivantes :

(1)

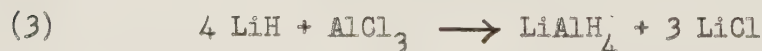


ce qui montre que 1 molécule d'hydrure double réduit 2 fonctions esters. Au cours d'une seconde phase, les alcoolates métalliques ainsi formés seront décomposés par l'eau en alcools et hydroxydes métalliques.



Suivant l'équation (1) il faut stoechiométriquement une demi molécule d'hydrure double par radical ester à réduire; en pratique toutefois on utilise 1,5 à 2 molécules d'hydrure par molécule d'ester (quantité doublée pour les acides dicarboxyliques).

Nous avons utilisé, tantôt le réducteur fourni par le commerce, tantôt celui préparé par nos soins au laboratoire suivant la méthode de Finholt, Bond et Schlesinger (3) et décrite aussi par Mahé et Coll. (34), c'est-à-dire par action d'une solution étherée anhydre de chlorure d'aluminium sur de l'hydrure de lithium finement broyé mis en suspension dans l'éther suivant



Lorsque la réaction, assez brutale, est achevée, on filtre l'hydrure en excès et le chlorure de lithium formé; il reste une solution étherée d'hydrure double.

Chaque fois nous avons dosé l'activité du produit par une méthode gazométrique simplifiée, mais d'une précision suffisante, consistant à mesurer dans une burette de Bünte le volume d'hydrogène dégagé par action de l'eau sur un poids donné d'hydrure finement broyé.

L'équation suivante



montre que si l'on pèse A mg et qu'il s'en dégage V cm³ de gaz, la teneur T

pour cent en hydrure double est donnée par :

$$T \% = \frac{41,5 \times V}{A}$$

Suivant l'origine de l'échantillon, la teneur varie fortement et va de 45 à 95 % en hydrure actif, le résidu étant formé d'hydroxyde. Nous avons d'ailleurs remarqué qu'à condition de tenir compte de la teneur utile du produit, la présence de ces hydroxydes métalliques inertes ne nuit en rien à la réduction.

B. Estérification :

Le premier stade de la préparation des alcools aminés est l'estérification de l'amino-acide. De nombreuses méthodes ont été proposées; la plupart des auteurs toutefois conserve le procédé déjà ancien de Curtius (35) dans lequel on opère en milieu anhydre en se servant comme agent estérifiant d'acide chlorhydrique gazeux. Des essais comparatifs nous ont fait préférer cette méthode et nous procédons comme suit :

L'amino-acide (10 g.) est mis en suspension dans environ 60 ml. d'éthanol absolu et on y fait passer sans refroidir un courant rapide d'acide chlorhydrique gazeux et sec. La dissolution de l'acide provoque un léger échauffement qui facilite la mise en solution de l'acide aminé. Lorsque la saturation est atteinte, ce qui se signale par l'apparition de vapeurs blanches, on chauffe 10 à 15 minutes à reflux au bain-marie puis on évapore sous vide à sec. On remet une quantité égale d'alcool et recommence de même le passage de l'acide chlorhydrique et l'évaporation.

On reprend encore une fois en allant à sec aussi parfaitement que possible car toute trace d'eau provoque une importante décomposition de l'ester dans les stades ultérieurs de la préparation.

On a obtenu ici le chlorhydrate d'ester d'amino-acide, c'est en général un sirop épais qui se prend en masse plus ou moins vite par refroidissement. Le chlorhydrate de glycollate d'éthyle cristallise aisément en grandes aiguilles. L'addition d'éther favorise cette cristallisation.

C. Régénération :

Ayant obtenu le chlorhydrate, il importe à présent d'en régénérer l'ester libre, celui-ci seul étant soluble dans l'éther et pouvant seul convenir à la réduction.

1) La méthode primitive de Fischer (36) consistait à dissoudre le chlorhydrate dans un minimum d'eau, à y ajouter à 0°, la quantité calculée de soude à 33 %, ensuite à saturer la solution de carbonate de potasse. Au fur et à mesure de cette adjonction, on extrait l'ester libéré à l'éther. Finalement on réunit les extraits, les sèche sur carbonate de calcium puis sur sulfate de soude et enfin, distillant l'éther il reste l'ester libre sous forme d'une huile épaisse.

Dans nos divers essais cette méthode ne nous a pas donné entière satisfaction : l'extraction, opérée même à l'aide d'un grand volume d'éther est difficilement complète - dans un essai après 4 extractions il restait en milieu aqueux près de 65 % du produit - et de plus, même en effectuant toutes ces opérations à basse température, la saponification de l'ester, extrêmement rapide pour certains amino-acides, en milieu aqueux et alcalin, provoque une importante perte.

2) Une méthode ultérieure, proposée par Levene (37), consiste à placer le chlorhydrate en suspension dans l'éther sur de la baryte et à agiter longuement en remplaçant à plusieurs reprises la baryte. Ce procédé ne nous a pas donné satisfaction : les deux produits, baryte et chlorhydrate, étant insolubles, la réaction se fait mal en milieu hétérogène.

3) Une troisième méthode proposée par Abderhalden (38) opère sur une solution

alcoolique du chlorhydrate et en régénère l'ester au moyen de la quantité calculée d'éthylate de sodium en solution alcoolique à 0°. On précipite le sel formé par l'éther, filtre et évapore la solution après séchage. La distillation de l'alcool en présence des esters libres entraîne une certaine quantité de ceux-ci, cause de perte qui nous a fait abandonner ce procédé.

4) Finalement la méthode qui nous a donné les meilleurs résultats et que nous avons retenue est la suivante (39) :

Le chlorhydrate est mis en suspension dans l'éther sec et on y fait passer, en maintenant le tout dans la glace, un courant rapide de NH_3 gazeux anhydre.

Ceci libère l'ester qui entre aussitôt en dissolution dans l'éther tandis que le chlorure d'ammonium formé précipite. On agite énergiquement pendant le passage du gaz. En fin d'opération, il suffit de filtrer le précipité blanc pour avoir une solution étherée de l'ester d'acide-amino. N'ayant jamais d'eau en présence, on ne doit pas craindre l'hydrolyse de l'ester, ni de perte par extraction incomplète, de fait ce mode opératoire peut être considéré comme quantitatif. La solution étherée obtenue sert sans plus à la réduction.

D. Technique de la réduction :

Toutes les opérations au cours desquelles on utilise l'hydrure double nécessitent une technique particulière due aux propriétés de ce réducteur. L'hydrure double de lithium et d'aluminium est une poudre blanche facilement décomposable tant par l'humidité que par l'oxygène. Ceci impose que son emploi se fasse en milieu anhydre et à l'abri de l'air.

A cet effet, nous avons opéré dans une "boîte sèche", enceinte cylindrique hermétique de métal où l'on réalise et entretient soigneusement une atmosphère d'azote sec et parfaitement débarrassée d'oxygène. La partie supérieure est formée d'une glace transparente épaisse adaptée à la boîte par un joint de caoutchouc; elle permet de voir l'intérieur de la boîte. Par des gants de caoutchouc fixés à deux orifices circulaires sur les parois, on manipule le contenu de la boîte. Enfin un système d'écluses à doubles portes entre lesquelles on peut faire le vide, autorise l'entrée et la sortie de divers objets sans altérer l'atmosphère entretenue dans l'appareil.

Dans la boîte sèche l'hydrure est broyé très finement au mortier, puis la quantité pesée est mise en solution dans l'éther. On place cette solution dans un ballon à 3 cols où l'on a adapté un agitateur électrique, un réfrigérant et une ampoule à décantation par laquelle on laisse couler goutte à goutte la solution étherée de l'ester, le tout en atmosphère d'azote sec et à la température ordinaire. Après addition de l'ester on agite pendant 20 à 30 minutes encore, puis on décompose l'excès de réducteur par une minime quantité d'eau. Cette addition d'eau a également pour but de décomposer l'alcoolate formé. On sépare la couche étherée par filtration sur Büchner de l'abondant précipité des hydroxydes métalliques formés. On extrait à l'ébullition ce résidu solide par 200 ml. d'éthanol absolu, à deux reprises.

Ces extraits alcooliques réunis et concentrés à 50 ml. sont additionnés d'un égal volume d'éther, ce qui provoque la précipitation de l'hydroxyde de lithium entraîné. On abandonne 24 heures à la chambre froide, filtre, réunit le filtrat à la solution étherée du début, et évapore les solvants. Il reste finalement un résidu huileux qui est soumis à la micro-distillation fractionnée sous vide (voir les constantes au paragraphe amino-alcools).

2° - Propriétés des Amino-alcools.

Nous donnons ici les constantes des aminoalcools que nous avons préparés par la réduction des acides correspondants. Pour quelques-uns d'entre eux nous formulons des remarques particulières.

L-Alaninol : (2 amino propanol 1)

Huile incolore. P.E. 80° (12 mm), (Karrer (24)).

DL-Valinol : (2 amino 3 méthyl butanol 1)

Cristallisé en aiguilles à la chambre froide;
huile à la température ordinaire, P.E. 88° (11mm).

DL-Leucinol : (2 amino 4 méthyl pentanol 1)

Huile incolore, P.E. 95-100° (10 mm) (24).

DL-Isoleucinol : (2 amino 3 méthyl pentanol 1).

Ce produit qui n'avait pas encore été obtenu précédemment est une huile incolore, P.E. 100° (10 mm). Nous en avons préparé un dérivé cristallisé, l'oxalate acide. On dissout pour cela environ 50 mg. de l'amino-alcool dans 1 ml. d'éthanol absolu, on y ajoute à chaud un excès d'acide oxalique dissous dans l'éthanol. A la chambre froide il cristallise de petites aiguilles blanches. Oxalate acide d'isoleucinol, P.F. 128°.

Serinol : (2 amino propanediol 1.3.)

Huile incolore, P.E. 120° (0,06 mm) (24).

DL. Thréoninol : (2 amino butanediol 1.5.)

Ce produit, huile jaune pâle, n'avait pas encore été obtenu antérieurement. Son P.E. est d'environ 160° (0,1 mm). Nous en avons préparé l'oxalate acide, P.F. 204°.

Cystéine : Cet amino-acide ne donne pas l'amino-alcool correspondant, l'hydru-re double le décompose avec départ d'hydrogène sulfuré. Dans un travail récent, Karrer (40) est parvenu à réduire le radical carboxylique d'un dérivé de la cystéine dans lequel le groupement sulfhydryle est protégé par une chaîne hydrocarbonée, la S-propyl-cystéine qui donne, par action de LiAlH_4 , le S-propylcystéinol.

Méthionine : Elle est décomposée comme la cystéine.

DL-Phénylalaninol : (2 amino 3 phényl propanol 1)

Solide blanc P.F. 64°5 (pression ordinaire) (24)

L-Tyrosinol : (2 amino 3 p-hydroxyphényl propanol 1)

Huile incolore, P.E. 170° (0,05 mm) (24)

L-Prolinol : (2 méthoxypyrrolidine)

Huile jaune pâle P.E. 150° (12 mm) (24)

Lysinol : (2,6 diamino hexanol 1)

Nous avons préparé cet amino-alcool par la même technique, mais il ne nous a pas été possible de le distiller ni par conséquent de l'avoir à l'état de parfaite pureté : le produit obtenu a toujours donné plusieurs taches par chromatographie. Néanmoins, il nous est possible de reconnaître parmi celles-ci une plus intense qui correspond au produit proprement dit et cette préparation, quelque imparfaite qu'elle soit, nous a suffi pour la recherche et l'identification de cet amino-alcool dans nos travaux ultérieurs.

DL-Histidinol : (2 amino 3 imidazole propanol 1)

Ce produit est obtenu par réduction de l'ester méthylique de la dibenzoylhistidine. On obtient ainsi le monobenzoylhistidinol, dont on isole le chlorhydrate de l'histidinol après hydrolyse. Histidinol, HCl P.F. 193-195° (Karrer (25)).

L-Tryptophanol :

Huile jaune épaisse P.E. 150-160° (0,04 mm) (26).

Acide aspartique : DL-Aspartidiol (2 amino butanediol 1.4.)

P.E. 130° (0,02 mm).

Acide glutamique : DL-Glutamidiol (2 amino pentanediol 1.5.)

La réduction des esters de ces acides donne seulement les dialcools

aminés correspondants. Dans le cas où l'un ou l'autre des radicaux carboxyliques de ces acides est engagé dans une liaison (peptidique par exemple), il ne serait pas réduit et donnerait naissance à un hydroxy-amino-acide dont il existe deux isomères tant pour l'acide aspartique que pour l'acide glutamique.

Ces deux acides constituent donc un problème à eux seuls, aussi valent-ils une étude particulière (41) qui sort du cadre général auquel nous nous limitons.

On remarquera cependant que dans le cas d'une protéine, les acides aspartique et glutamique situés dans l'enchaînement peptidique et possédant encore un groupe carboxylique libre, donnent par réduction l'un de ces amino-acides hydroxylés, homologues supérieurs de la sérine.

Toutefois, ils ne sont pas solubles dans l'éther en milieu alcalin, ne sont donc pas touchés par le procédé d'extraction décrit plus loin; ils ne sont pas non plus adsorbés sur silice et n'interviennent aucunement dans nos méthodes d'isolement des amino-alcools.

3° - Isolement et Caractérisation des Amino-Alcools.

Pour l'isolement des amino-alcools dans un hydrolysate de protéine réduite nous avons eu recours soit à l'extraction à l'éther, soit à la chromatographie sur silice et sur charbon.

A - Extraction à l'éther :

Les amino-alcools étant solubles dans certains solvants organiques (éther) alors que les amino-acides ne le sont pas, l'extraction à l'éther en milieu alcalin peut servir à la séparation de ces produits. Nous avons étudié les conditions d'une telle extraction et l'avons appliquée à l'hydrolysate de l'insuline réduite. Toutefois une telle extraction présente des inconvénients : spécificité imparfaite et faible rendement en amino-alcools isolés.

B - Chromatographie sur silice :

Le caractère basique très prononcé des amino-alcools leur confère la propriété de s'adsorber sur échangeurs d'ions comme les amino-acides basiques. Nous avons utilisé à cet effet les résines synthétiques (Zeo Carb 215 et Dowex 50) (48-51), et surtout la silice (47).

Si l'on chromatographie un hydrolysate de protéine réduite sur une colonne de silice, dans le filtrat on trouve les amino-acides neutres et acides, et dans l'éluate les amino-alcools éventuels et les bases hexoniques. Les essais suivants définissent les conditions d'une telle séparation :

a) Colamine pure : Une colonne de 15 g. de silice est lavée au préalable par 100 ml de HCl N/10 et 100 ml d'eau; puis on y fait passer la solution de 10 mg de colamine dans 5 ml d'eau. On lave successivement par 4 fractions de 30 ml d'eau, fractions dans lesquelles on ne décèle pas de colamine, celle-ci étant retenue quantitativement sur la colonne, et enfin on élue par 100 ml HCl N/10 où l'on retrouve 96 % de la colamine.

b) Colamine et acides aminés neutres : Sur une colonne identique, on fait passer 5 mg de colamine et 5 mg de glycocolle. L'acide aminé se retrouve quantitativement dans les eaux de lavage de la colonne et la colamine dans l'acide chlorhydrique d'élution.

c) Colamine et acides aminés basiques : On fait passer sur une même colonne 5 mg de colamine et 10 mg du mélange des bases hexoniques (arginine, lysine, histidine); cette fois la totalité de ces produits se retrouve dans l'éluate chlorhydrique.

d) Leucinol et Phénylalaninol : Ces amino-alcools se comportent de la même façon que la colamine au cours de la chromatographie sur silice.

La silice peut donc servir à la séparation quantitative des amino-alcools.

C - Chromatographie sur charbon :

Le caractère aromatique de certains amino-alcools (phénylalaninol en particulier) leur confère la propriété de s'adsorber sur charbon actif, tout comme les acides aminés aromatiques. Cette propriété peut être mise à profit pour l'isolement de ces amino-alcools.

On utilise du charbon Activit XP 50 préparé suivant Fromageot, Jutisz et Lederer (47) en présence d'hydrogène sulfuré, milieu réducteur protégeant les corps adsorbés de la destruction au contact des impuretés du charbon.

La colonne de charbon est d'abord lavée par une solution à 5 % d'acide acétique. On y fait passer ensuite la solution d'analyse, lave par de l'eau acétique et enfin les amino-alcools aromatiques retenus sont élués par de l'eau saturée d'acétate d'éthyle.

(Mode opératoire : voir paragraphe ovomucöide).

Pour l'identification des amino-alcools ainsi isolés, nous avons utilisé principalement la chromatographie sur papier. Nous avons étudié aussi leur comportement à l'ionophorèse sur papier.

D - Chromatographie sur papier :

Solvants : Nous avons étudié à cet effet le comportement des alcools aminés dans un grand nombre de solvants parallèlement à celui des amino-acides correspondants :

A { Butanol n 75 parties Eau 10 - Ac. formique 15 -	B { Butanol n. 4 parties Ethanol 10 - Eau 50 -
C { Alc. benzy- lique Eau à saturation	D { Butanol n. 40 parties Dioxane 10 - Eau à saturation
E { Ether éthylique NH ₃ 10 % à saturation	F { Butanol n. 77 parties Ac. acétique 6 - Eau 14
G { Butanol n. Eau à saturation NH ₃ 0,1 %	H { Phénol 74 parties en poids Eau 25,5 - NH ₃ 0,5 %
I { Butanol 3 parties N méthyl- morpholine 1 - Eau à saturation	J { Butanol 50 parties Alc. ben- zylique 50 - Eau à saturation
K { Alcool isoamylique Eau à saturation	L { Alcool benzylique Eau à saturation
M { Pyridine 1 partie Butanol 4 - Eau à saturation	

Les meilleurs résultats ont été donnés par les solvants suivants, qui seuls ont été utilisés d'une façon générale :

- I. n butanol (77 p.) + ac.acétique (6 p.) + eau (17 p.)
- II. n butanol saturé d'eau + 0,1 % NH_3
- III. phénol saturé d'eau + 0,1 % NH_3

Le tableau I donne les valeurs de R_F de divers amino-alcools primaires (colonnes B) et des acides correspondants (colonnes A) pour ces trois solvants, sur papier Whatman n° 1, température 22°.

Au sujet de ces valeurs de R_F , on peut faire les remarques suivantes :

1.- Les alcools aminés ont, dans un mélange solvant donné, des R_F supérieurs à ceux des amino-acides correspondants. Ceci s'explique par le fait que les amino-alcools ayant un coefficient de partage moins en faveur de l'eau que les amino-acides, sont entraînés davantage par la phase mobile organique.

2.- Dans le cas des acides aspartique et glutamique où deux fonctions acides sont en cause, cette variation de R_F est beaucoup plus marquée.

3.- Le solvant G (butanol ammoniacal) bien que ne permettant pas de séparation d'amino-alcools entre eux, présente cependant un intérêt : en milieu basique les acides aminés retenus dans la phase aqueuse sous forme saline ne se déplacent presque pas, tandis que les amino-alcools sont tous situés à proximité immédiate du front. L'utilisation de cet effet permet de distinguer dans la plupart des cas d'une façon certaine l'ensemble des amino-alcools de l'ensemble des amino-acides.

4.- Certains solvants, d'un emploi plus limité, nous ont permis la séparation de deux ou trois amino-alcools difficilement séparables par les solvants généraux :

(a) crésol saturé d'eau en atmosphère faiblement ammoniacale :

{ sérinol R_F 0,38
{ thréoninol R_F 0,59

(b) pyridine 35 parties, alcool isoamylique 35 parties, eau 27 parties (42) :
{ isoleucinol R_F 0.46
{ leucinol R_F 0.49
{ phénylalaninol R_F 0.54

5.- Il apparaît parfaitement possible, par l'emploi de solvants convenablement choisis, de caractériser sans ambiguïté chacun des amino-alcools.

6.- Enfin les valeurs de R_F sont celles des amino-alcools sous forme de bases libres. Leur emploi sous forme de chlorhydrate ou de sulfate modifie légèrement ces chiffres.

Révélation des taches. - Comme les amino-acides, les amino-alcools peuvent être révélés à la ninhydrine (44), bien que la réaction soit 10 à 15 fois moins sensible. Il faut donc environ 6 à 10 mg d'amino-alcool par ml de la solution chromatographiée. Le tableau suivant donne les quantités d'amino-alcools nécessaires pour avoir une tache intense, après chromatographie sur papier, développement à la ninhydrine.

T A B L E A U I.

	I		II		III	
	A	B	A	B	A	B
Gly.	0.07	0.18	0.06	0.15	0.33	0.74
Ala.	0.13	0.25	0.12	0.23	0.56	0.83
Ser.	0.06	0.16	0.06	0.15	0.32	0.69
Threo.	0.10	0.15	0.09	0.31	0.48	
Val.	0.30	0.40	0.24	0.49	0.77	-1.-
Leu.	0.46	0.53	0.44	0.63	0.81	-1.-
Ileu.	0.44	0.50	0.39	0.63	0.82	-1.-
Pro.	0.15	0.28	0.14	0.26	0.88	-1.-
Phala.	0.39	0.54	0.44	0.70	0.82	-1.-
Tyr.	0.21	0.40	0.24	0.54	0.59	0.81
A-Asp.	0.05	0.19	0.01	0.23	0.17	0.82
A-Glu.	0.09	0.21	0.01	0.23	0.23	0.83
Lys.	0.02	0.08	0.01	0.07	0.53	0.78
Arg.	0.04	0.08	0.03	0.07	0.68	
His.	0.03	0.08	0.07	0.12	0.64	

Acides aminés :	Alcools aminés :
Glycocolle 1 à 2 μ g	Colamine 12 μ g
Alanine 2	Alaninol 25
Isoleucine 2,5	Isoleucinol 40
	Valinol 50
	Phénylalaninol 50
	Prolinol 100

Le traitement de révélation se pratique pour les amino-alcools comme pour les amino-acides : sur la feuille séchée; on vaporise une solution à 0,2 % de ninhydrine dans le n.butanol, sèche à nouveau, puis chauffe 3 à 5 minutes à 100-105°.

La coloration rose violacée est la même que celle obtenue avec les amino-acides. Le prolinol donne une tache jaune comme la proline; il est donc préférable, pour révéler cet amino-alcool, d'utiliser la solution d'isatine qui fournit une tache bleue comme pour la proline (45).

Nous avons utilisé également la méthode proposée par Dent et Crumpler (46), et basée sur la réaction spécifique des α -amino-acides, avec le carbonate basique de cuivre CO_3Cu , $\text{Cu}(\text{OH})_2$ donnant un complexe ne réagissant plus à la ninhydrine. Dès lors, si l'on traite sur papier un mélange d'amino-alcools et d'amino-acides au carbonate de cuivre, puis à la ninhydrine, seuls les amino-alcools devront donner la coloration avec ce réactif. Cette méthode est peu sensible.

Nous avons enfin essayé la méthode à l'iode, proposée par Bearts (43). Elle consiste soit à placer la feuille séchée après chromatographie dans une enceinte en présence de vapeurs d'iode, ou bien à vaporiser la feuille d'une solution alcoolique d'iode, puis à sécher à l'étuve pour chasser l'iode en excès. Ceci permettrait de distinguer les amino-acides des amino-alcools qui seuls donnent une coloration brune due à un composé iodé d'addition. Toutefois cette méthode ne nous a pas donné satisfaction car elle est d'une technique malaisée et, de plus, fort peu sensible.

E - Ionophorèse sur papier :

Nous avons étudié le comportement des amino-alcools à l'ionophorèse sur papier en utilisant un appareil analogue à ceux décrits par Cremer et Tiselius (53) d'une part, et par McDonald et ses Collaborateurs (54) d'autre part.

Des gouttelettes de solutions aqueuses à environ 2 mg par ml d'amino-alcools sont placées sur une feuille de papier Schleicher et Schülle n° 2043 B imprégnée d'une solution tampon. On établit une différence de potentiel de l'ordre de 10 volts par cm et laisse l'ionophorèse se poursuivre pendant quelques heures. Au bout de ce temps la feuille est retirée, séchée et les amino-alcools révélés à la ninhydrine.

On définit le déplacement des substances par leur mobilité μ (54). Celle-ci s'exprime par :

$$\mu = \frac{l}{t \cdot v}$$

l = distance parcourue en cm

t = durée de l'ionophorèse en sec.

v = gradient de potentiel en volts/cm.

Cette grandeur dépend du pH du milieu et de la concentration moléculaire du tampon.

Le tableau II donne les valeurs de μ observées à pH 9.3 dans le tampon véronal 0.05 M, pour quelques amino-alcools.

TABLEAU II.

Colamine	110 . 10 ⁻⁶
Alaninol	104 . 10 ⁻⁶
Valinol	89 . 10 ⁻⁶
Leucinol	85.5 10 ⁻⁶
Phénylalaninol	63.4 10 ⁻⁶
Sérinol	59 . 10 ⁻⁶
Aspartidiol	76 . 10 ⁻⁶
Glutamidiol	72 . 10 ⁻⁶

Les valeurs de mobilité données par le tableau II montrent que l'ionophorèse permet de réaliser des séparations différentes de celles données par la chromatographie. Elle fait, en effet, appel à une propriété distincte. La séparation chromatographique était basée sur le coefficient de partage entre les deux phases. Le déplacement ionophorétique dépend principalement du potentiel électrocinétique de la substance (55,56).

4° - Détermination quantitative des Amino-Alcools.

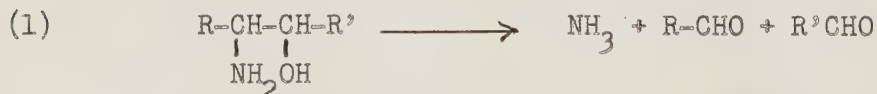
La détermination quantitative des amino-alcools, purs, en solution, peut se faire par le dosage d'azote (micro-Kjeldahl).

Une réaction plus spécifique est celle de l'acide périodique avec des fonctions hydroxyle et amine en position α l'une de l'autre. Cette réaction, dans les conditions décrites plus loin, peut se faire en présence de quantités importantes d'acides aminés (sauf les hydroxyamino-acides) et convient, par exemple, pour le dosage d'amino-alcools en présence des bases hexoniques sur l'éluat d'une chromatographie sur silice.

Nous avons également utilisé la spectrophotométrie en ultra-violet pour les amino-alcools à noyau aromatique.

A - Dosage par l'acide périodique :

Déjà en 1928 Malaprade (69) avait montré que les polyols sont attaqués à froid rapidement par l'acide périodique, lequel est réduit en acide iodique. Fleury et Coll. (70-76) d'une part Shin et Nicolet (79-82) d'autre part, reprirent bientôt l'étude de cette réaction et montrèrent que l'acide périodique coupe et oxyde quantitativement toute chaîne hydrocarbonée entre deux groupements à H actif suivant les réactions générales :



L'étude de ces réactions a montré de plus que :

1°- la fonction alcool doit être libre (estérifiée, elle ne réagit plus);

2°- les deux fonctions doivent nécessairement être portées par des atomes de C contigus;

3°- la fonction aminée peut être primaire, secondaire ou tertiaire, mais dans ces deux derniers cas, qui n'ont encore été que fort peu étu-

diés, la réaction semble plus lente (88);

4°- les amino-acides, les acides alcools et les diamines subissent une réaction analogue mais extrêmement lente qui peut être négligée à côté de celle due aux amino-alcools et dialcools;

5°- les acides soufrés (cystéine et méthionine) subissent une oxydation au niveau du -SH mais sans production de NH_3 ni d'aldéhyde;

6°- ces remarques ne sont valables qu'à la température ordinaire, car à plus haute température certains corps et notamment les amino-acides, sont oxydés, qui ne le sont pas normalement.

En pratique et dans notre cas on peut donc considérer cette réaction d'oxydation comme spécifique des amino-alcools.

Parmi les produits de la réaction, suivant le corps sur lequel elle a porté, on peut trouver :

- 1) l'ammoniaque provenant de la fonction amine;
- 2) le formol venant de la fonction alcool primaire;
- 3) quant à la chaîne carbonée portant la fonction aminée, elle donne l'aldéhyde avec un carbone en moins que le produit de départ.

On voit immédiatement l'intérêt d'une telle réaction pour la chimie analytique; un grand nombre de travaux a été publié où elle est appliquée au dosage de la sérine, la thréonine, le glycérol, l'éthanolamine, l'hydroxyllysine.

La réaction de l'acide périodique avec les amino-alcools se fait à la température ordinaire; elle exige un milieu nettement alcalin. On emploie le métaperiodate de sodium ou, plus commodément, l'acide périodique et un grand excès de carbonate de potasse.

Dans les diverses applications aux protéines décrites dans la troisième partie, nous avons eu recours au dosage iodométrique de l'aldéhyde formé, et, d'une façon plus générale, au dosage de l'ammoniac formé.

Suivant la quantité d'amino-alcool sur laquelle porte le dosage, nous avons utilisé des techniques différentes.

Pour des quantités de 0,200 mg à 1,0 mg d'amino-alcool, le dosage s'effectue dans l'appareil à dosage d'ammoniac (82); au bout de 15 minutes de contact, on détruit l'excès d'acide périodique par l'hyposulfite (87), puis on distille l'ammoniac sous un léger vide, dans un courant de vapeur d'eau. On achève par acidimétrie. (Mode opératoire : voir l'application à l'Insuline).

Pour des quantités inférieures à 0,200 mg et jusqu'à 0,01 mg, nous avons opéré par microdiffusion dans des cellules de Conway (114) et achevé le dosage par colorimétrie à l'aide du réactif de Nessler (115). (Mode opératoire : voir l'application à l'ovomucöide).

B - Absorption en ultra-violet :

Les amino-alcools à noyau aromatique, tout comme les acides aminés correspondants, possèdent un spectre d'absorption caractéristique en ultra-violet. Nous avons eu recours à cette propriété pour le dosage photométrique du phénylalaninol (voir application à l'ovomucöide).

La même détermination pourrait être utilisée pour le tyrosinol et le tryptophanol.

Troisième Partie.

Application aux Protéines.

Généralités :

Possédant les données préliminaires indispensables à notre travail, nous sommes passés directement à l'étude d'une protéine.

On a vu que les auteurs tentèrent presque toujours d'appliquer les méthodes de détermination des groupes caractéristiques proposées, d'abord à des peptides de poids moléculaire relativement faible. Dans notre cas également des essais ont été faits parallèlement sur des peptides : la réaction semble présenter des difficultés avec la plupart d'entre eux.

Ceci toutefois constitue un point particulier qui sort du champ de notre travail et n'est pas traité ici, d'autant plus que le problème est en fait distinct car la nature physicochimique de la protéine diffère tellement de celle du peptide qu'une réaction chimique que l'on tente d'appliquer à ces produits doit être reconsidérée dans chaque cas.

Alors que dans le peptide les dimensions moléculaires restreintes laissent aux différents radicaux leur caractère chimique entier et permettent l'interaction de ces radicaux, il est permis d'envisager que dans la protéine, la grandeur de la molécule devient un caractère prépondérant et que les divers radicaux se trouvant fort éloignés les uns des autres auront moins d'influence réciproque.

Or, on sait que l'action du réducteur se porte presque exclusivement sur des radicaux électronégatifs, à caractère acide. Il est probable que dans un peptide la proximité de la fonction amine électropositive inhibe plus ou moins la réduction. Dans la protéine au contraire la fonction carboxylique à réduire se trouve relativement éloignée des autres fonctions gênantes. Ceci pourrait expliquer la facilité relative avec laquelle nous avons pu réduire, dans les protéines, les radicaux carboxyliques libres, et ce, avec un rendement assez élevé, alors que dans les peptides il est indispensable, pour rendre la réaction possible, d'estérifier les radicaux carboxyliques, les esters étant plus facilement réductibles que les carboxyles libres (30).

Nous avons appliqué la méthode que nous proposons successivement à l'insuline et à l'ovomucôide. Dans l'application à l'insuline, après réduction et hydrolyse, nous avons fait usage de l'extraction à l'éther pour l'isolement des amino-alcools. Toutefois n'ayant pas isolé la protéine réduite, nous avons opéré en présence des sels minéraux provenant du réducteur et leur présence a considérablement gêné les stades ultérieurs de l'opération.

Dans le cas de l'ovomucôide nous avons isolé la protéine réduite et fait usage de la chromatographie sur silice pour la séparation des amino-alcools.

1. Insuline.

Comme première application de la méthode que nous proposons nous avons choisi l'Insuline, d'une part, car cette protéine a suscité déjà de nombreux travaux et que sa constitution brute ainsi que quelques points de sa structure ont pu être établis, et d'autre part, car il est possible d'obtenir cette substance, cristallisée dans un état de pureté pleinement satisfaisant.

Nos investigations ont porté sur des échantillons d'insuline cristallisée qui nous ont été offerts soit par la Maison Choay, Paris (insuline à 20 U.I./mg), soit par le Dr. J. Lens (insuline de boeuf à 27 U.I./mg). Ce dernier échantillon peut être considéré comme étant la protéine pure. On sait en effet par les travaux de Lens que l'insuline la plus soigneusement purifiée ayant une courbe de solubilité parfaitement horizontale (ce qui est l'un des meilleurs critères de pureté des protéines) titre d'après des essais physiologiques portant sur 90 lapins : $26,8 \pm 0,8$ U.I./mg (58).

Les résultats que nous avons obtenus sont qualitativement identiques pour les insulines de diverses origines.

A - Réduction de la protéine :

Le premier problème s'offrant à nous est celui du milieu réactionnel. L'insuline ne présente aucun solvant commun avec l'hydrure double de lithium et d'aluminium. Il est donc impossible d'opérer la réduction par simple mise en solution.

Nous avons tenté l'estérification des radicaux carboxyliques de la protéine par la technique décrite à propos des amino-acides, à savoir par l'éthanol absolu et l'acide chlorhydrique anhydre. Toutefois la protéine ainsi estérifiée n'est pas soluble dans l'éther et de plus elle présente alors la fâcheuse tendance à l'agglomération en une masse amorphe sur laquelle il est difficile de faire porter la réaction.

Nous avons dès lors admis la possibilité de travailler en milieu hétérogène en faisant agir le réducteur sur une suspension d'insuline dans un solvant inerte. Nous avons à cet effet essayé divers solvants :

éther éthylique
éther butylique
N méthyl morpholine
N éthyl morpholine
cellosolve,

et nous avons constaté expérimentalement que de l'insuline séchée au pistolet à l'acétone, très finement broyée, se maintenait le mieux en suspension dans la N éthyl morpholine. Nous avons constaté de plus que l'adjonction d'une faible proportion d'une substance tensioactive, le chlorure de diméthylalkylbenzyl ammonium ("Zéphirol" de Bayer) favorise visiblement cette mise en suspension de la protéine et retarde la sédimentation des particules.

Remarquons que dans un travail déjà ancien (1932), Freudenberg et Coll. (59) dans le but d'étudier l'acétylation de l'insuline opéraient sur une suspension fine de la protéine dans la pyridine ou la quinoléine. Ils obtinrent par cette méthode des résultats tout à fait satisfaisants, ce qui montre que, même en milieu hétérogène, une réaction portant sur l'insuline peut être complète.

D'une façon générale, on peut prévoir que l'action de l'hydrure double sur la protéine se traduira par les faits suivants :

1) réduction des radicaux carboxyliques libres, correspondant aux bouts de chaîne, en fonctions alcools primaires.

2) réduction de même des radicaux carboxyliques γ de l'acide aspartique et de δ l'acide glutamique, dans le cas où ces radicaux sont libres. Ceci, comme il a été dit, donne naissance à des acides-alcools-aminés qui échappent à notre procédé d'extraction et n'interviennent donc pas.

3) réduction des groupes disulfures S-S jusqu'au stade sulfhydryle -SH, sinon davantage. On sait en effet que ces groupes S-S sont aisément réduits et de nombreux travaux ont porté sur ce sujet dans l'insuline elle-même (60-67). Strating et Baker (68) ont montré que les disulfures aliphatiques et aromatiques sont réduits en mercaptans et thiophénols par l'hydrure double de lithium et d'aluminium.

4) dénaturation de la protéine. Cette transformation physicochimique est due ici, à la fois à l'emploi du solvant, du détergent et du réducteur. Nous n'avons pas cependant à en tenir compte car il ne s'agit là, vraisemblablement, que de rupture de liaisons secondaires de la protéine n'affectant pas sa configuration peptidique fondamentale.

Ces données nous permettent de calculer la quantité théorique de réducteur nécessaire pour agir sur une molécule d'insuline (P.M. 12.000).

Les travaux analytiques récents donnent pour l'insuline la formule suivante en acides aminés (45,47,57) :

Gly 7 - Ala 6 - Ser 6 - Cys(S-S)6 - Thré 2 - Val 8 -
Leu 13 - Ileu 2 - Pro 2 - Phényl 2 - Tyr 8 - Asp 5 -
Glu 16 - Arg 2 - His 4 - Lys 2 - $-NH_2$ 12.

On aura donc à réduire par molécule au maximum :

5 groupes carboxyliques de l'acide aspartique
16 groupes carboxyliques de l'acide glutamique
6 groupes -S-S- de la cystine
4 groupes carboxyliques terminaux (chiffre moyen supposé)

31 groupes réductibles.

Donc, puisque comme on l'a vu, une molécule d'hydrure double réduit deux fonctions carboxyliques, il faudra par molécule d'insuline 16 molécules de réducteur. Nous avons pu voir, par l'étude des alcools aminés, qu'il est utile de mettre un excès important de réducteur en présence du produit à réduire.

Mode opératoire : Nous décrivons à présent le mode opératoire suivi dans une expérience portant sur un échantillon d'insuline de boeuf à 27 U.I./mg.

La réduction est effectuée dans l'appareil représenté par la figure 1. On reconnaît sur cette figure :

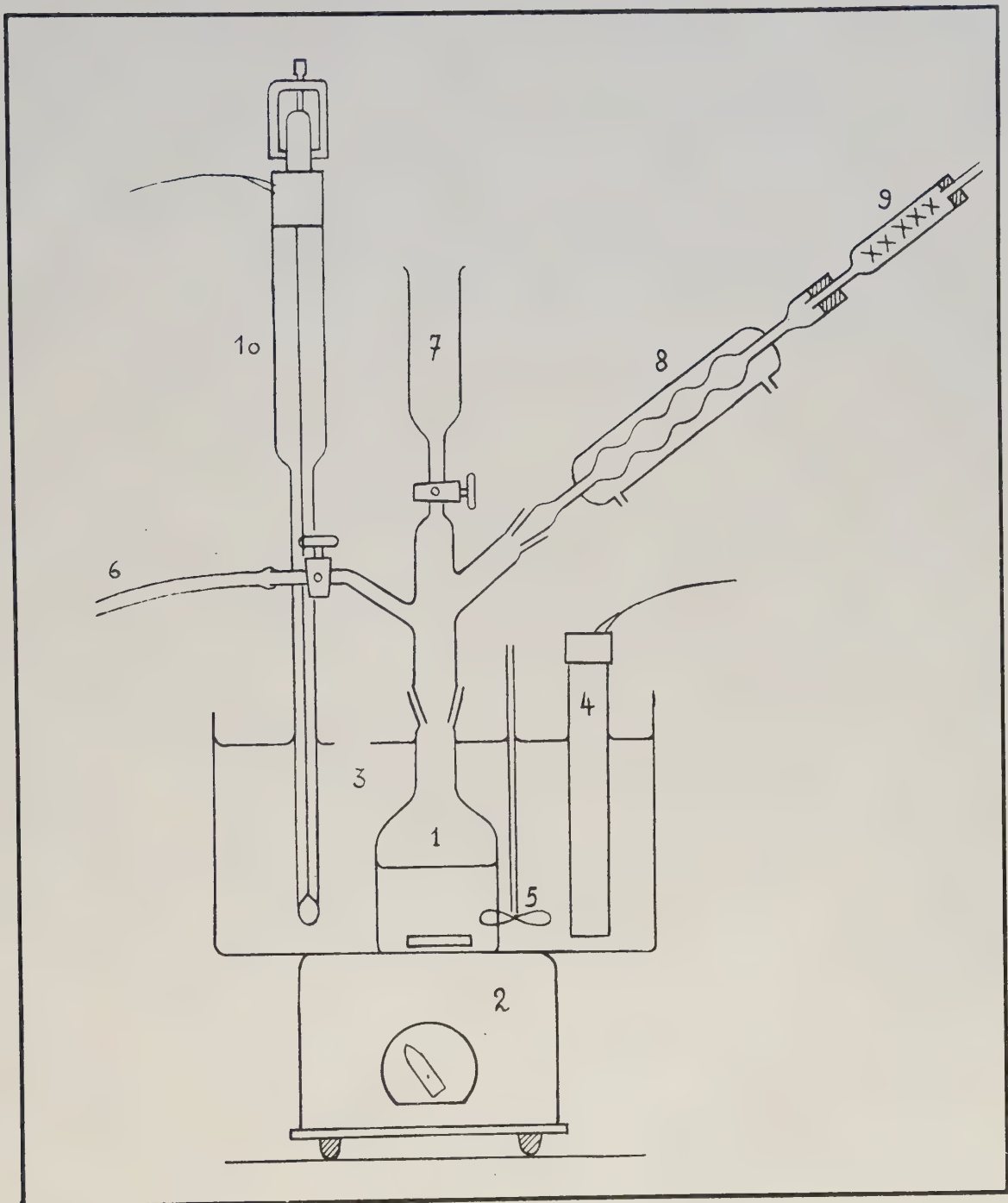
1. ballon à fond plat pour la réduction
2. agitateur magnétique
3. bain d'eau
4. lame chauffante
5. agitateur du bain d'eau
6. arrivée d'azote sec sans oxygène
7. entonnoir à robinet
8. réfrigérant à reflux
9. tube desséchant à SO_4Ca anhydre
10. thermostat

L'appareil, en verre Pyrex, est muni de rodages normalisés et est approximativement à l'échelle 1/4. Les différents supports n'ont pas été représentés sur la figure.

300 mg de la protéine finement broyée et parfaitement séchée à 60° sous vide sont mis en suspension dans 50 ml de N éthyl morpholine additionnés de 0,02 % de Zéphiro1. Le tout est agité énergiquement pendant qu'on y introduit goutte à goutte une solution de 160 mg d'hydrure double dans 50 ml de N éthyl morpholine, l'hydrure employé étant ici approximativement à 95 %. Cette opération se fait à 55° sous atmosphère d'azote sec, et dure 8 heures.

Au bout de ce temps, on décompose l'hydrure subsistant par quelques gouttes d'eau, puis on filtre sur Büchner. On élimine soigneusement la N éthylmorpholine par lavage du précipité à l'éther. Ce précipité est formé

Fig. I.



APPAREIL POUR LA REDUCTION DES PROTEINES.
(explications voir texte)

de la protéine traitée et du résidu minéral (hydroxydes) provenant de l'hydrure décomposé. Ensuite on porte quantitativement ce précipité dans un ballon où la protéine est hydrolysée par 30 ml d'acide chlorhydrique 6 N à reflux pendant 24 heures. L'acide utilisé doit être sensiblement plus concentré (environ 9 N) pour tenir compte de sa neutralisation partielle par les bases résultant de la décomposition de l'hydrure.

Lorsque l'hydrolyse est terminée, on élimine l'acide chlorhydrique libre par des concentrations sous vide successives alternant avec des additions d'eau distillée.

On a donc obtenu à ce stade un mélange complexe contenant les amino-alcools éventuels sous forme de chlorhydrates, les amino-acides et les sels métalliques.

B - Isolement des amino-alcools par extraction à l'éther :

La mise au point d'une méthode d'extraction des amino-alcools par l'éther a demandé un grand nombre d'essais et nous avons eu à modifier plusieurs fois la technique avant de parvenir à celle utilisée pour l'Insuline.

Dans la première méthode, la solution résultant de l'hydrolyse de la protéine réduite est extraite à l'éther dans un appareil fonctionnant en continu pendant plusieurs heures.

Dans ces conditions, la séparation d'une part est peu satisfaisante, car l'éther se saturant en eau, dissout une quantité non négligeable d'acides et d'autre part, le rendement est médiocre, le coefficient de partage des amino-alcools étant nettement en faveur de l'eau. Des essais témoins ont montré qu'en 24 heures on n'extraît que 15 à 25 % de la quantité d' amino-alcools en présence.

Pour rendre l'extraction quantitative et la séparation totale, il fallait l'opérer en absence d'eau. Dans ce but nous avons tenté d'abord de fixer cette eau par du sulfate de soude anhydre et ensuite, avec plus de succès, par une quantité convenable de "Hyflusupercell". Ce produit, variété de silice en poudre, après lavage à l'eau, à l'éther et séchage à 110°, est capable d'absorber et de retenir une proportion d'eau assez considérable.

Mode opératoire : La solution résultant de l'hydrolyse est concentrée au dessiccateur et amenée à l'état sirupeux, puis alcalinisée jusqu'à pH 9-10 par quelques gouttes de soude concentrée, le liquide étant maintenu froid par la glace, puis absorbé aussi complètement que possible par une quantité convenable (quelques grammes) de Hyflusupercell. On obtient ainsi une masse à l'aspect pulvérulent et sec. On l'extraît à l'éther, au soxhlet pendant 30 heures.

Les amino-alcools passent dans l'éther. A la solution éthérée obtenue au bout de ce temps on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique N/100. On élimine l'éther par évaporation, puis on complète par de l'eau le volume du liquide résiduel à 10 ml. C'est sur cette solution (solution IR) que l'on effectue les caractérisations par chromatographie sur papier et les dosages.

Les dosages effectués sur les solutions témoins (IT) montrent que l'extraction en phase solide telle qu'elle vient d'être décrite, a un rendement d'environ 50 %, aussi avons-nous, ultérieurement, développé l'étude de cette opération en vue de la rendre plus complète.

La méthode décrite n'opère pas en milieu tout à fait anhydre, la neutralisation de l'hydrolysate faite par quelques gouttes d'une solution concentrée de soude caustique laisse une quantité non négligeable d'eau dans le milieu. Or, le coefficient de partage des amino-alcools est en faveur de l'eau, ce qui explique les difficultés d'extraction.

La méthode que nous avons mise au point s'efforce de rendre le milieu aussi parfaitement anhydre que possible. La solution obtenue après hydrolyse est additionnée de 0,5 ml d'acide sulfurique à 20 % pour transformer les chlorhydrates d' amino-alcools en sulfate non volatils, puis on évapore

plusieurs fois avec des additions d'eau distillée pour chasser l'acide chlorhydrique de l'hydrolysate. On neutralise ensuite la masse obtenue au moyen de baryte anhydre finement broyée que l'on mélange intimement. La réaction de neutralisation provoque la formation d'une très faible quantité d'eau, qui rend bientôt la masse pâteuse. On ajoute de la baryte jusqu'à pH 9-10. On ajoute la quantité voulue de Hyflosupercell pour obtenir une masse sèche. On la place dans une cartouche et extrait à l'éther pendant 30 heures. Dans l'éther on a placé 1 goutte SO_4H_2 qui fixe les amino-alcools sous une forme non volatile au fur et à mesure de leur isolement.

Il suffit, finalement, de chasser l'éther, de reprendre par quelques ml d'eau, pour avoir une solution renfermant les amino-alcools sous forme de sulfate.

C - Etude qualitative par chromatographie sur papier :

Des fractions de la solution IR sont placées sur des feuilles de papier Whatman n°1, parallèlement à des solutions témoins des divers amino-alcools, et chromatographiées soit à l'aide du solvant I (n butanol 77 + acide acétique 6 + eau 17), soit à l'aide du solvant III (phénol saturé d'eau + 0,1 % NH_3). Ces chromatogrammes permettent d'observer dans le cas de la solution IR l'existence de deux taches très nettes dont les R_F correspondent, à un léger décalage près, au R_F du chlorhydrate de colamine et du chlorhydrate d'alaninol, respectivement. En outre il apparaît quelques taches plus faibles, ne correspondant à aucun autre amino-alcool connu. Pour pouvoir identifier avec certitude la colamine et l'alaninol, nous avons opéré de la façon suivante : 160 mg d'hydrure double ont été décomposés par un peu d'eau; au produit résultant on ajoute 200 mg d'insuline, 5 ml d'une solution aqueuse contenant 5,0 mg de colamine et 8,9 mg d'alaninol, et 20 ml d'acide chlorhydrique 9 N. Le tout est maintenu à l'ébullition à reflux pendant 24 heures. Au bout de ce temps on continue les opérations comme dans le cas de la réduction proprement dite de l'insuline. On obtient ainsi une solution témoin de colamine et d'alaninol (solution IT). Sur une même feuille de papier on effectue parallèlement la chromatographie dans le solvant I de la solution d'analyse (IR), de la solution témoin (IT) et d'une solution aqueuse des chlorhydrates de colamine et d'alaninol.

Les résultats, très nets, sont illustrés par la figure 2. Ils montrent que :

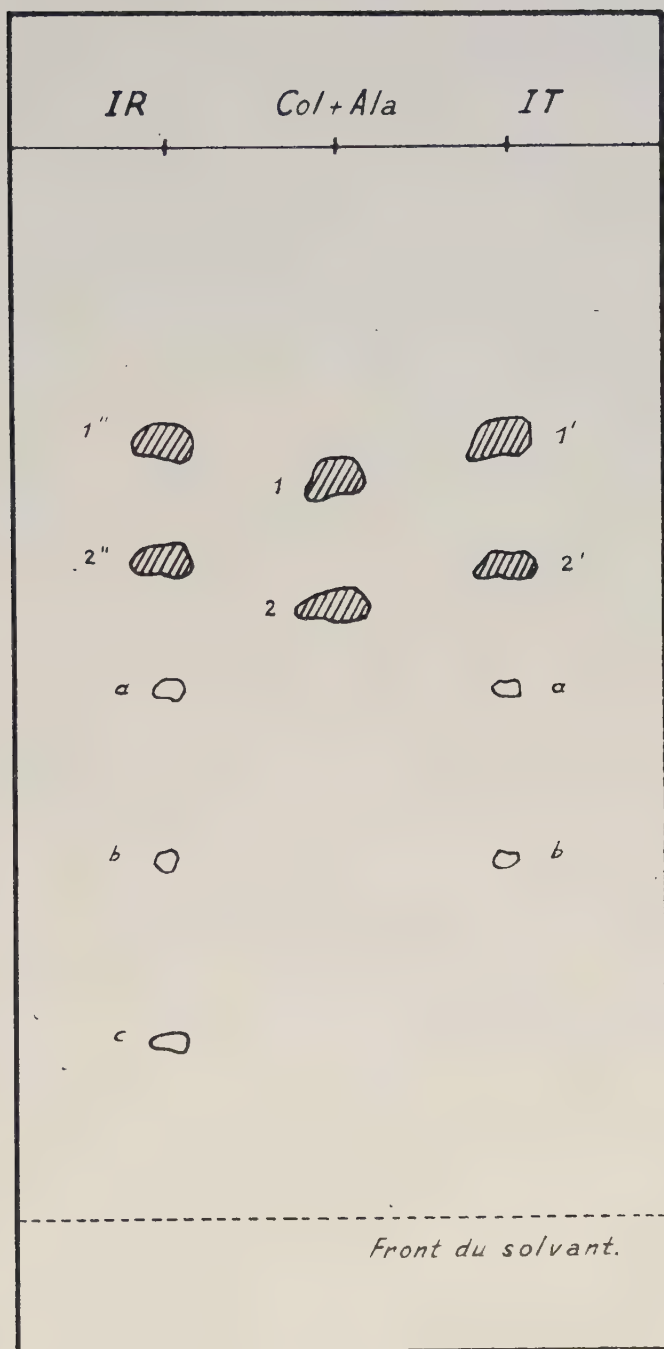
1° - Les taches 1' et 2' données par la solution IT et qui correspondent respectivement au chlorhydrate de colamine et au chlorhydrate d'alaninol, sont légèrement décalées vers le haut par rapport aux taches 1 et 2 données par la solution pure de ces produits. Ce décalage est dû aux sels contenus dans la solution IT, sels dont nous avons pu en effet constater la présence et qui sont les mêmes et en même quantité que dans la solution IR.

2° - Les taches 1" et 2" données par la solution IR dont les R_F sont identiques à ceux des taches 1' et 2' peuvent être ainsi attribuées avec certitude au chlorhydrate de colamine et au chlorhydrate d'alaninol respectivement.

3° - Parmi les autres taches, les taches a et b se trouvent avec la solution IT comme avec la solution IR, elles ne témoignent donc pas de la présence d'autres amino-alcools que la colamine et l'alaninol. La tache qui n'est donnée que par la solution IR possède un R_F supérieur à ceux de tous les amino-alcools et amino-acides connus, elle est due probablement à quelque artefact.

4° - Enfin nous avons effectué également un essai "à blanc". 300 mg d'insuline sont traités tout comme la solution d'analyse, sauf la réduction, c'est-à-dire que cet échantillon, additionné des produits résultant de la décomposition de 160 mg de réducteur, puis hydrolysé à reflux, est extrait par la technique décrite. On obtient ainsi une solution qui, chromatographiée, ne donne aucune tache.

Fig. II.



Ceci montre que les taches 1" et 2" sont bien dues aux produits de la réduction.

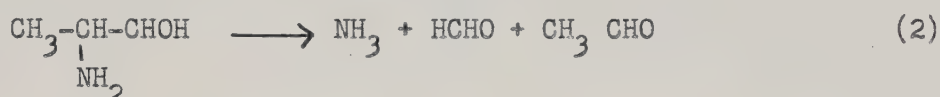
D - Etude quantitative :

Ayant identifié par chromatographie la nature des amino-alcools obtenus, nous en avons effectué la détermination quantitative, détermination qui a pu en outre confirmer la nature de ces amino-alcools.

A cet effet nous avons effectué sur les solutions IR et IT les dosages suivants :

1. Azote total (Kjeldahl)
2. Azote de l'ammoniac dégagé par action de l'acide périodique sur l'ensemble des amino-alcools
3. Acétaldéhyde formé par action de l'acide périodique sur l'alaninol
4. Ions chlore.

Pour le mélange de colamine et d'alaninol, nous avons utilisé un dosage différentiel fondé sur le fait suivant : la colamine, sous l'action de l'acide périodique, donne 2 molécules de formol (1)



tandis que l'alaninol donne une molécule de formol et une molécule d'acétaldéhyde (2). A la température ordinaire, l'acétaldéhyde seul est volatil, tandis que le formol ne l'est pas. Il suffit donc de doser d'une part le NH_3 total et d'autre part l'acétaldéhyde recueilli dans une solution bisulfique. Cette dernière réaction se fait dans la cellule à microdiffusion, et le dosage final par iodométrie.

Dosage de l'ammoniac périodique total -

Ce dosage se fait dans l'appareil à aération suivant la technique décrite parallèlement par Van Slyke (82) pour l'hydroxylysine, et Martin et Synge (83) pour la sérine et la thréonine.

La solution à analyser contenant environ 0,200 mg d'amino-alcool, est placée dans le ballon de l'appareil. On y verse, dans l'ordre, 10 ml d'une solution de CO_2K_2 à 50 % et 1 ml d'une solution d'acide périodique 0,2 M. On laisse la réaction se faire pendant 15 minutes à la température ordinaire, ensuite on détruit l'excès d'acide périodique par adjonction de 5 ml d'une solution d'hyposulfite 0,1 N et on distille l'ammoniac formé, pendant 12 min., dans un courant de vapeur d'eau. Le distillat est reçu dans 2 ml. d'une solution SO_4H_2 0,02 N dont on titre l'excès.

Dosage de l'acétaldéhyde volatil -

Ce dosage se fait suivant la technique décrite par Winnick et appliquée par lui à la thréonine et à l'acide lactique (84,85,86).

La solution à analyser renfermant environ 0,200 mg d'alaninol est placée dans la cuvette centrale d'une cellule de Conway et additionnée de 1 ml de phosphate tripotassique 0,01 M. Dans la partie préiphérique on place 1 ml de bisulfite de soude 0,25 M. Immédiatement avant de refermer la cellule, on verse dans la solution d'analyse 1 ml d'acide périodique 0,2 M et après fermeture on fait le mélange des liquides par une prudente agitation.

On abandonne 4 à 5 heures à la température ordinaire. L'acétaldéhyde formé distille et vient se combiner au bisulfite.

Au bout de ce temps on enlève le couvercle, recueille soigneusement la solution périphérique et y oxyde d'abord l'excès de bisulfite par une solution d'iode N. Ensuite on ajoute du PO_4Na_3 en poudre qui décompose le com-

plexe aldéhyde bisulfite et finalement on dose le bisulfite libéré par l'iode 0,005 N.

On a la relation 1 ml iode 0,005 N = 0,187 mg alaninol, toutefois les dosages sont faits de préférence par rapport à une solution étalon d'alaninol ayant à peu près la même concentration.

Dosage des ions Cl⁻

Ce dosage a été fait par la méthode volumétrique, au nitrate d'argent (117).

Les chiffres obtenus dans ces divers dosages sont donnés par le tableau II.

La colonne IR a trait à la solution d'analyse et la colonne IT est celle de la solution témoin renfermant des quantités connues de colamine et d'alaninol à laquelle on a fait subir intégralement le même traitement et la même extraction qu'à la solution d'analyse.

Les chiffres donnés par la solution IT montrent que la récupération des amino-alcools est loin d'être quantitative, des expériences faites à ce point de vue nous ont montré que les pertes en amino-alcools étaient dues d'une part à leur volatilité au moment des évaporations, d'autre part à l'imperfection de l'extraction proprement dite.

Quoi qu'il en soit les résultats obtenus avec la solution IT fournissent des facteurs de correction permettant d'évaluer la quantité des amino-alcools initialement présents dans l'hydrolysate de la protéine réduite, à partir des quantités effectivement présentes dans la solution obtenue (IR).

Si l'on applique ces facteurs correctifs aux données fournies par l'analyse de l'insuline réduite on obtient des chiffres que nous nommerons insuline corrigée (IR cor.) et il apparaît immédiatement que ces valeurs sont proches de celles qui correspondraient à deux molécules de colamine et deux d'alaninol par molécule élémentaire (12.000) d'insuline.

Enfin dans la dernière colonne (approximation) le rendement pour cent représente bien cette proximité, l'erreur ne dépasse jamais 10 %.

Or, selon Tristram (118) le calcul montre que si dans une molécule de protéine on veut déterminer l'un des constituants, il faut, pour pouvoir en donner le nombre A, que son dosage soit fait avec précision d'autant plus grande que ce composant figure à un plus grand nombre d'exemplaires dans la protéine. Pour que le nombre A soit défini sans ambiguïté à moins d'une unité près, il doit être de la forme :

$$A = X \pm 0,4$$

X étant un nombre entier, et pour cela le dosage doit être fait avec une erreur maximum donnée par :

$$E \% = \frac{\pm 40}{A}$$

Dans notre cas, nous avons affaire à deux molécules d'alaninol et de colamine respectivement; il suffira pour que le dosage soit décisif qu'il soit à ± 20 % près.

Le fait que l'extrait témoin et la solution d'analyse renferment tous deux la même quantité de sel témoigne en faveur de l'identité de conditions de ces deux extractions et justifie aussi l'application à la solution d'analyse des termes correctifs fournis par le témoin.

Enfin, compte tenu du rendement de l'extraction, la réduction des groupes carboxyliques libres en groupes alcools primaires paraît avoir été quantitative

TABLEAU III.

Dosage de l'insuline réduite.

	IT	IR	IR. cor.	2 Alaninol + 2 Colamine	Approxima- tion
<u>N total</u> mg					
théorique	2,72		1,26	1,40	
trouvé	1,62	0,76			
rendement %	60				90
<u>N périodique</u> mg					
théorique	2,72		1,28	1,40	
trouvé	1,47	0,69			
rendement %	54				91
<u>Alaninol</u> mg					
théorique	8,90		4,06	3,75	
trouvé	2,80	1,30			
rendement %	32				108
<u>Colamine</u> mg					
théorique	5,00		2,74	3,05	
trouvé	4,20	2,30			
rendement %	84				90
<u>Cl⁻</u>					
trouvé mg	110	110			

E - Interprétation des résultats :

L'ensemble des résultats obtenus dans notre travail, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, montre que dans la molécule élémentaire d'insuline deux molécules d'alanine et deux molécules de glycocolle ont leurs groupes carboxyliques libres.

Voyons à présent comment ces données s'ajoutent à celles antérieurement établies.

On sait que l'insuline, qui a un poids moléculaire proche de 48.000, peut être considérée comme formée de 4 unités, ou molécules élémentaires, chacune d'un poids voisin de 12.000 et de nature polypeptidique homogène (45,89,90). Il y a quelques années, Sanger (1,91,94) a mis en évidence le fait que cette molécule élémentaire est constituée à son tour de 4 sous éléments, chacun d'eux étant une chaîne peptidique reliée aux autres par les ponts disulfures de la cystine. Ces chaînes sont probablement deux à deux identiques ou tout au moins extrêmement voisines. Sanger montre ensuite que dans deux de ces chaînes peptidiques, appelées fraction A, l'acide aminé N-terminal est le glycocolle, dans les deux autres, formant la fraction B, c'est la phénylalanine.

Ainsi il n'existe, en tout, dans la molécule élémentaire d'insuline, que deux acides aminés N-terminaux différents, représentés chacun par deux molécules. Il apparaît donc particulièrement intéressant de ne trouver également, dans la même molécule élémentaire, que deux acides aminés C-terminaux, le glycocolle et l'alanine, qui sont représentés, eux aussi, par deux molécules chacun.

Ce résultat apporte un argument de plus à l'identité des deux chaînes peptidiques constituant la fraction A ainsi que de celles de la fraction B.

On remarquera que la détection de l'alanine comme acide aminé terminal dans l'insuline confirme les résultats obtenus par Lens (10) avec une tout autre technique. Cet auteur faisant agir la carboxypeptidase sur la protéine, observe dans les premières heures de l'hydrolyse l'apparition de produits ultra-filtrables qu'il identifie avec l'alanine par chromatographie. Il n'observe pas toutefois l'apparition de glycocolle.

Ultérieurement, Chibnall (95) a repris la détermination des radicaux carboxyliques libres dans l'insuline, par réduction des amino-acides en amino-alcools. Toutefois, en utilisant l'hydrure de bore et de lithium moins actif que celui de lithium et d'aluminium, il a été obligé d'estérifier la protéine avant la réduction. Cet auteur n'a pas publié le détail de ses expériences, mais ses résultats semblent confirmer les nôtres.

2. Ovomucoïde.

L'ovomucoïde est une glucoprotéine du blanc d'oeuf au poids moléculaire de 28.000 (98). Sa composition telle qu'elle résulte des derniers travaux analytiques, est donnée par le Tableau IV. (99-103).

L'ensemble des amino-acides représente 86 % de l'azote total et 66 % en poids. Le reste est constitué principalement par des molécules d'hydrate de carbone. Suivant Stacey et Wooley, qui ont étudié cette fraction glucidique, elle représenterait environ 20 % en poids (99,100).

Il apparaît donc que le bilan de la composition de l'ovomucoïde n'est pas terminé et il est possible que cette protéine renferme des constituants encore inconnus.

La différence entre le nombre de groupements aminés libres (14) et le nombre de résidus lysyl (12) suggère la présence de deux chaînes peptidiques (103). Toutefois, Fraenkel-Conrat et Porter (105), utilisant la technique des DNP, trouvent un seul amino-acide N-terminal, l'alanine, ce qui correspondrait donc à une seule chaîne polypeptidique.

Un problème particulier est posé dans le cas de l'ovomucoïde par la présence des sucres et de la glucosamine. Les chiffres fournis par la littérature présentent des discordances au sujet de la teneur exacte en oses.

Suivant Stacey et Woolley (99) qui ont isolé ces composants sous forme de dérivés méthylés, ils seraient dans le rapport suivant :

{ 7 radicaux N-acétyl-glucosamine
 3 radicaux mannose
 1 radical galactose

D'après ces auteurs, ces divers oses forment un polysaccharide dont on connaît mal le mode d'union avec le reste polypeptidique. Cette union serait toutefois assez labile puisqu'il a été possible d'isoler la fraction glucidique entière.

Dans le but de remédier aux imperfections de la méthode telle qu'elle est décrite pour l'insuline, nous avons été amenés à envisager à nouveau chaque stade du procédé et à y apporter des modifications. Nous nous sommes d'abord attachés à isoler et à purifier la protéine réduite. Pour cela nous avons procédé à la dialyse suivie de concentration et, après congélation, séchage sous vide poussé (lyophilisation). Sur cette protéine réduite nous avons effectué les dosages :

{ N total
 N amidé
 Histidine et Tyrosine

A - Réduction et Isolement de la Protéine réduite :

Réduction -

500 mg de la protéine finement broyée et parfaitement séchée à 60° sous vide sont mis en suspension dans 30 ml de N éthyl morpholine. On y introduit 400 mg d'hydrure double mis en solution dans 30 ml de N éthyl morpholine. On agite énergiquement au moyen d'un agitateur magnétique, l'opération se faisant à 60° sous atmosphère d'azote sec et durant 8 heures. Au bout de ce temps, on décompose l'hydrure subsistant par quelques gouttes d'eau, puis on filtre sur Büchner. On élimine soigneusement la N éthyl morpholine par lavage du précipité à l'éther. Ce précipité est formé de la protéine traitée et du résidu minéral (hydroxydes) provenant de l'hydrure décomposé.

Isolement du ou des amino-alcools par extraction à l'éther -

Dans l'une des expériences préliminaires, nous avons extrait à l'éther, après hydrolyse du mélange complexe obtenu à ce stade, le ou les amino-alcools éventuellement formés. Cette extraction a été faite dans des conditions analogues à celles qui ont été décrites précédemment pour l'insuline. Le produit ainsi extrait, repris par l'eau, a été chromatographié sur

TABLEAU IV.

Composition de l'^{oo}OVOMUCOÏDE.

Acides - Aminés	%	N ^{bre}
Alanine	2,3	11
Arginine	3,7	6
Ac. Aspartique	13,0	28
Ac. Glutamique	6,1	15
Cystéine - SH	6,3	16
Glycine	3,8	15
Histidine	2,2	4
Isoleucine	1,4	3
Leucine	5,1	11
Lysine	6,0	12
Méthionine	0,9 - 1,4	2
Phénylalanine	2,9	5
Proline	2,7	7
Sérine	4,2	11
Thréonine	5,5	13
Tyrosine	3,4	5
Tryptophane	0,3 - 2,0	0 - 1
Valine	6,0	16

papier Whatman n°1 avec un mélange (en volumes) butanol 75 + acide acétique 7 + eau 18, en même temps que la plupart des amino-alcools correspondant aux acides aminés de l'ovomucoïde. Le chromatogramme obtenu montre une seule tache nette de R_F 0,60, voisine des taches fournies par l'isoleucinol 0,56, le phénylalaninol 0,59, et le leucinol 0,61. Il n'est donc pas possible de dire ici auquel ou auxquels de ces trois derniers amino-alcools doit être attribuée la tache obtenue à partir de l'ovomucoïde.

L'extraction par l'éther présente divers inconvénients, parmi lesquels d'une part le fait que cette opération n'est pas quantitative, et d'autre part le fait qu'elle n'est pas absolument spécifique des amino-alcools; même lorsque les amino-acides sont sous forme de sels de baryum, et en milieu pratiquement anhydre, l'éther entraîne toujours une petite quantité de divers acides aminés, auxquels sont dues des taches faibles mais néanmoins visibles.

Dialyse : Le précipité obtenu après la réduction doit être dissout en vue de la dialyse; il importe de ne pas abandonner trop longtemps la protéine au contact des hydroxydes, cela la rendrait insoluble. Le précipité placé dans un tube de centrifugeuse est neutralisé par l'acide chlorhydrique 6 N puis faiblement acidifié, le volume total étant d'environ 20 ml. On agite 10 minutes, on centrifuge, et décante la liqueur claire. On répète ce processus quatre à cinq fois jusqu'à ce que la totalité - ou presque - du précipité soit dissoute. A ce moment on place la solution dans une membrane de cellophane et procède à la dialyse, d'abord contre de l'eau courante pendant 18 heures puis contre de l'eau distillée plusieurs fois renouvelée, pendant 6 heures.

Au bout de ce temps la solution débarrassée de ses sels est concentrée par évaporation à travers le tube dialyseur au moyen d'un courant d'air chaud jusqu'au volume de 30 ml, puis, placée dans un ballon, elle est congelée par le mélange acétone-glace carbonique et enfin, lyophilisée. On obtient finalement un produit blanc, léger, sec : l'ovomucoïde réduit. Cette substance étant hygroscopique est conservée en tube scellé sous vide.

Dosage de l'azote total : Suivant les préparations, le produit obtenu titre de 9,7 à 11,2 % d'azote; il renferme encore une faible quantité d'alumine. Tous les calculs ultérieurs tiennent compte de la teneur réelle en azote.

Dosage de l'histidine et de la tyrosine : La teneur en azote de l'ovomucoïde réduit étant un peu inférieure à celle de l'ovomucoïde initial, pour avoir un terme de comparaison entre ces deux protéines, en vue des déterminations quantitatives, il est indispensable de doser un composant non affecté par la réduction. Nous avons dosé, à cet effet, l'ensemble histidine + tyrosine par la réaction de Pauly (111) sur l'ovomucoïde initial et l'ovomucoïde réduit.

Pour cela des quantités de l'ordre de 6 mg de ces deux produits sont hydrolysées par 2 ml HCl 6 N en tube scellé. On porte ensuite à 10 ml et dose parallèlement sur les deux solutions l'azote total et histidine + tyrosine :

{ Histidine + Tyrosine	0,288 mg
{ N total	0,682 mg

ovomucoïde réduit :

{ Histidine + Tyrosine	0,235 mg
{ N total	0,564 mg

Les rapports donnés par ces deux dosages pour les deux produits sont identiques (voir Tableau V). Ceci montre qu'il n'y a pas de modification sensible de la teneur en azote au cours de la réduction et des opérations ultérieures.

De ces dosages on peut conclure :

- d'une part qu'il sera parfaitement justifié de rapporter les dosages ultérieurs d'amino-alcools à la teneur en azote total de la protéine réduite;

- d'autre part que la partie de la molécule contenant la glucosamine n'a pas été éliminée au cours du traitement.

Dosage de l'azote amidé : 154 mg d'ovomucoïde réduit sont hydrolysés en tube scellé sous vide, par l'acide chlorhydrique 6 N à 105° pendant 18 heures. Au bout de ce temps, l'hydrolysats est évaporé sous vide à plusieurs reprises avec adjonction d'eau à chaque fois. La dernière fois, on reprend par l'eau et porte au volume de 25 ml. Sur une partie aliquote de cette solution on dose l'azote total :

Azote total : 14,85 mg.

La solution neutralisée par quelques gouttes de lithine N est amenée à pH 8,5 (début de virage de la phénolphtaléine) et placée dans l'appareil à distillation d'ammoniac. Sous un léger vide et à 35°, on fait passer pendant 15 minutes un courant de vapeur d'eau en récoltant le distillat dans 15 ml d'acide borique à 0,5 %. Il est indispensable qu'au cours de cette distillation, la solution ne soit pas réduite à un trop faible volume, faute de quoi on risquerait de perdre les amino-alcools. Finalement on titre l'ammoniac qui, seul, a distillé dans ces conditions.

On récolte soigneusement la solution qui a, ainsi, été débarrassée de l'ammoniac provenant des radicaux amidés de la protéine :

Azote amidé : 1,105 mg ou 7,44 % de l'azote total.

Or, dans l'ovomucoïde non réduit l'azote amidé représente 7,53 % de l'azote total. Ceci signifie donc qu'il n'y a pas de modification sensible de la teneur de la protéine en azote amidé au cours de la réduction et que les fonctions amidées ne sont pas altérées par la réaction.

L'ensemble des résultats de ces dosages figure sur le tableau V.

Tableau V

	Ovomucoïde	Ovomucoïde réduit
N total	13,1	9,7 %
$\frac{N \text{ amidé}}{N \text{ total}}$	$\frac{1,00}{13,1} = 7,53$	$\frac{1,105}{14,85} = 7,44 \%$
$\frac{Hist + Tyr}{N \text{ total}}$	$\frac{0,288}{0,682} = 0,424$	$\frac{0,235}{0,564} = 0,420$

B - Séparation et Identification des Amino-Alcools :

(a) Chromatographie sur silice -

Pour effectuer une séparation quantitative des amino-alcools nous avons tout d'abord utilisé la chromatographie sur silice (47). On a vu (voir p.12) que le caractère basique très prononcé des amino-alcools leur confère la propriété de s'adsorber sur silice, en même temps que les amino-acides basiques.

Des expériences préliminaires nous ont en effet montré que, en l'absence de sels, 6 g de silice retiennent parfaitement les substances suivantes : arginine 4,5 mg + lysine 7,6 mg + histidine 2,7 mg (quantités

qui correspondent à 100 mg d'ovomucoïde) + phénylalaninol 0,54 mg ou leucinol 0,42 mg. L'élution par HCl 0,1 N dans les conditions habituelles permet de récupérer quantitativement ces substances.

L'hydrolysât d'ovomucoïde réduit, dont on a éliminé l'ammoniac provenant des groupes amidés est tout d'abord débarrassé des sels minéraux (LiCl) dans un appareil à déminéralisation par électrolyse (113). On place la solution à déminéraliser, émenée à un volume de 10 ml, dans cet appareil et on fait passer pendant 20 minutes le courant sous une tension croissant de 20 à 130 volts et avec une intensité décroissant de 1 à 0,3 ampères.

Des expériences témoins, faites sur quelques amino-alcools (collamine, alaninol, phénylalaninol, aspartidol, glutamidol) nous ont montré que ceux-ci ne sont pas détruits au cours d'une telle opération : 10 ml d'une solution de l'amino-alcool, contenant environ 1 mg de ce dernier et 50 mg de LiCl, sont soumis à la dessalification dans les mêmes conditions; un dosage par l'acide périodique permet de retrouver la totalité de l'amino-alcool traité.

La solution déminéralisée est concentrée à 10 ml, ajustée à pH 7 et chromatographiée sur silice (6g). On élimine les acides aminés neutres et acides de même que les sucres non aminés par lavage par 100 ml d'eau. On élue ensuite les substances adsorbées : acides aminés basiques, glucosamine et amino-alcools, par 100 ml de HCl 0,1 N. L'éluat est concentré sous vide jusqu'à 1 ml. Environ 0,1 ml sont utilisés pour une chromatographie sur papier Schleicher et Schülle 507 avec un mélange (en volumes) : pyridine 35 + alcool isoamylique 35 + eau 27, en même temps que des quantités déterminées de phénylalaninol, leucinol et isoleucinol.

Un tel solvant présente en effet l'avantage de permettre une séparation convenable de ces trois derniers amino-alcools. Le chromatogramme obtenu (Fig. 4) permet d'observer trois taches groupées, de R_F 0,02 à 0,04 et correspondant aux bases hexoniques, une tache de R_F 0,13 correspondant à la glucosamine et une tache de R_F 0,67; ce R_F est identique à celui de la tache correspondant au phénylalaninol; il diffère nettement de ceux du leucinol (0,61) et de l'isoleucinol (0,59). L'ovomucoïde a donc fourni par réduction une seule espèce d'amino-alcool, le phénylalaninol.

Dans le but d'effectuer une estimation grossière des quantités de phénylalaninol, ainsi identifié, nous avons comparé la tache de R_F 0,67 obtenue dans cette chromatographie sur papier, avec les taches données par une échelle standard de phénylalaninol et correspondant respectivement à 8, 20, 40 et 80 μ g de cet amino-alcool. Une estimation visuelle nous a conduits à situer notre tache entre celles données par les points 40 et 80 de l'échelle standard. D'après cette évaluation, la solution renfermerait donc, au total, environ 500 μ g de phénylalaninol, quantité correspondant, compte tenu de la teneur en azote total du produit initial, à environ 0,75 molécule de phénylalaninol par molécule d'ovomucoïde.

(b) Chromatographie sur charbon -

Pour isoler à l'état pur le phénylalaninol, en vue de sa caractérisation certaine et de son dosage, nous avons effectué une deuxième séparation en mettant en oeuvre le caractère aromatique de cet amino-alcool qui, comme les acides aminés aromatiques, est spécifiquement adsorbé sur charbon, (Activit XP 50) (47).

Des expériences préliminaires nous ont en effet montré que 100 mg de ce charbon, constituant une colonne de 2,5 mm de diamètre, retiennent, en présence d'acide acétique à 5 % au moins 0,54 mg de phénylalaninol sans fixer les acides aminés basiques ni la glucosamine. L'élution du phénylalaninol ainsi adsorbé se fait quantitativement par l'eau saturée d'acétate d'éthyle.

L'éluat concentré de la colonne de silice, débarrassé de l'excès d'acide chlorhydrique par évaporations successives, repris par une solution d'acide acétique à 5 % (volume total environ 2 ml) et saturé d'hydrogène sulfuré, est versé sur une colonne de 100 mg de charbon; on lave la colonne par 3 ml d'acide acétique à 5 % saturé d'hydrogène sulfuré, puis on élue par 8 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré. Ce nouvel éluat est concentré sous vide jusqu'à sec de façon à éliminer totalement hydrogène sulfuré et acétate d'éthyle, puis est amené par l'eau à 1 ml. On prélève 0,1 ml pour une chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 avec le solvant pyridine + alcool isoamylique + eau, décrit plus haut. On chromatographie sur le même papier le filtrat qui a été de son côté également concentré et amené à 1 ml.

Le chromatogramme obtenu (Fig. 4) montre que l'isolement du phénylalaninol est excellent; c'est là une nouvelle preuve de l'identité de cet amino-alcool, caractérisé ici par son noyau aromatique.

La figure 4 représente ces diverses chromatographies sur papier:

1. Bases hexoniques témoins
2. Glucosamine
3. Isoleucinol
4. Leucinol
5. Phénylalaninol
6. Eluat de la chromatographie sur silice
7. Filtrat de la chromatographie sur charbon
8. Eluat de la chromatographie sur charbon.

C - Déterminations quantitatives :

(a) Dosage par l'acide periodique -

La quantité de phénylalaninol présente étant très faible, nous avons été conduits à mettre au point un micro-dosage des amino-alcools. Pour cela la réaction à l'acide periodique est effectuée en cellule de Conway (114). L'ammoniac formé est reçu dans une solution d'acide borique puis dosé par colorimétrie au moyen du réactif de Nessler (115). Il est possible, par ce procédé, de doser 10 à 150 μ g d'amino-alcool.

Mode opératoire : Dans la partie centrale de la cellule on place 1 ml d'acide borique à 1 %. Dans la partie périphérique on place dans l'ordre :

- la solution d'analyse,
- 2 ml d'une solution de CO_3K_2 à 50 %,
- 1 ml d'une solution de $\text{I O}_4\text{H}$ 0,2 M.

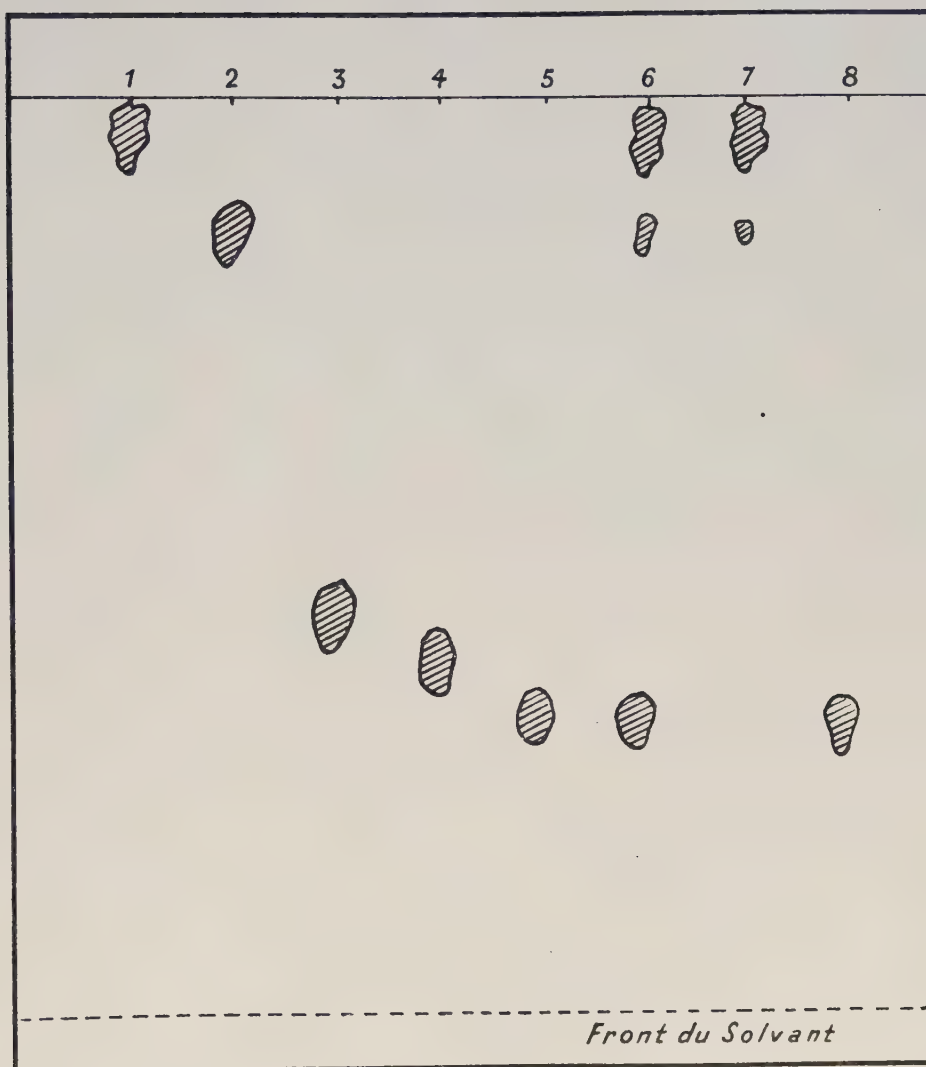
On referme aussitôt la cellule et laisse la microdiffusion se faire pendant 4 heures à la température ordinaire. Au bout de ce temps on place la solution centrale dans un ballon jaugé de 5 ml en rinçant la cuvette quatre fois par 0,5 ml d'eau. On ajoute 0,5 ml de réactif de Nessler. On porte au volume et lit, à $\lambda = 400 \text{ m}\mu$, la coloration au spectrophotomètre de Beckman.

Résultats : Ce dosage, effectué sur une partie aliquote de l'éluat de la chromatographie sur charbon, nous a montré que, dans la totalité de cet éluat, on avait recueilli :

Phénylalaninol : 0,490 mg (3,25 μ mol)

Tenant compte de ce qu'on est parti d'une quantité de protéine réduite correspondant à 14,85 mg d'azote total, et en admettant que la teneur en azote total de la protéine pure soit de 13,1 % et que son poids moléculaire soit de 28.000, on voit que les 3,25 μ mol de phénylalaninol trouvés, cor-

Fig. IV



CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOMUCOÏDE
(voir texte)

respondent à $4,08 \mu\text{mol}$ d'ovomucoïde, soit $0,80$ résidu de phénylalaninol par molécule d'ovomucoïde soumis à la réduction.

(b) Spectre d'absorption en ultra-violet -

Nous avons déterminé le spectre d'absorption ultra-violet de la solution provenant de l'éluat du charbon et l'avons comparé à la courbe établie pour le phénylalaninol synthétique.

Cette détermination constitue d'une part une identification supplémentaire de la nature de l'amino-alcool isolé, et d'autre part nous a permis un dosage photométrique précis de cette substance.

Aucune donnée sur le spectre ultra-violet du phénylalaninol n'existant dans la littérature, nous avons fait des déterminations de ce spectre sur des solutions 1.10^{-3} M de cet amino-alcool. Les mesures ont été faites à la température de $18-20^{\circ}$, au moyen d'un spectrophotomètre de Beckman à optique de quartz, l'épaisseur des solutions étant de 1 cm. Dans les régions où les courbes présentent des variations importantes, les points ont été mesurés tous les $1 \text{ m}\mu$ ou même tous les $0,5 \text{ m}\mu$. Nous désignons par ϵ le coefficient d'adsorption moléculaire.

Les spectres du phénylalaninol ont été déterminés successivement dans HCl $0,1$ M, dans l'eau et dans NaOH $0,1$ M. Ils sont représentés respectivement par les courbes I, II et III de la figure 6. Nous donnons, à titre de comparaison sur la même figure, le spectre (IV) de la phénylalanine dans HCl $0,1$ M (116).

Les six bandes du phénylalaninol ainsi mises en évidence, dont les positions et les maxima sont donnés dans le tableau IV, sont assez voisines de celles de la phénylalanine; mais, comme on devait d'ailleurs s'y attendre, alors que dans le cas de l'acide aminé il n'y a guère de différence entre le spectre de la solution acide et celui de la solution neutre, et qu'il y a une différence sensible entre le spectre de ces deux solutions et le spectre de la solution alcaline, pour l'amino-alcool, il n'y a guère de différence entre le spectre de la solution alcaline et le spectre de la solution aqueuse, une différence nette se manifestant entre le spectre de ces deux solutions et celui de la solution acide.

Une fraction aliquote de l'éluat du charbon correspondant à $10,0$ mg d'azote total est évaporée à sec sous vide et reprise par HCl $0,1$ M, le volume total de la solution obtenue étant $2,92$ ml.

On détermine sur cette solution le spectre d'absorption en ultra-violet, et constate l'identité de ce spectre avec celui du phénylalaninol en milieu HCl $0,1$ M.

La densité optique au maximum à $257,5 \text{ m}\mu$ est $0,167$; à cette même longueur d'onde, l'absorption moléculaire du phénylalaninol pur est de 216 . La concentration de l'amino-alcool dans la solution analysée est donc $0,772 \cdot 10^{-3}$ M.

On peut ainsi calculer comme on l'a fait après le dosage chimique que le nombre de résidus de phénylalaninol par molécule d'ovomucoïde soumis à la réduction est de $0,82$, chiffre en excellent accord avec celui trouvé au moyen de l'acide periodique.

Cette valeur permet d'établir la courbe d'absorption moléculaire de la substance provenant de l'éluat du charbon, à partir de la courbe de la densité optique de la solution correspondante. On trouve ainsi le spectre de la figure 5, pratiquement identique à celui du phénylalaninol dans HCl $0,1$ N.

D - Interprétation des Résultats et Conclusions :

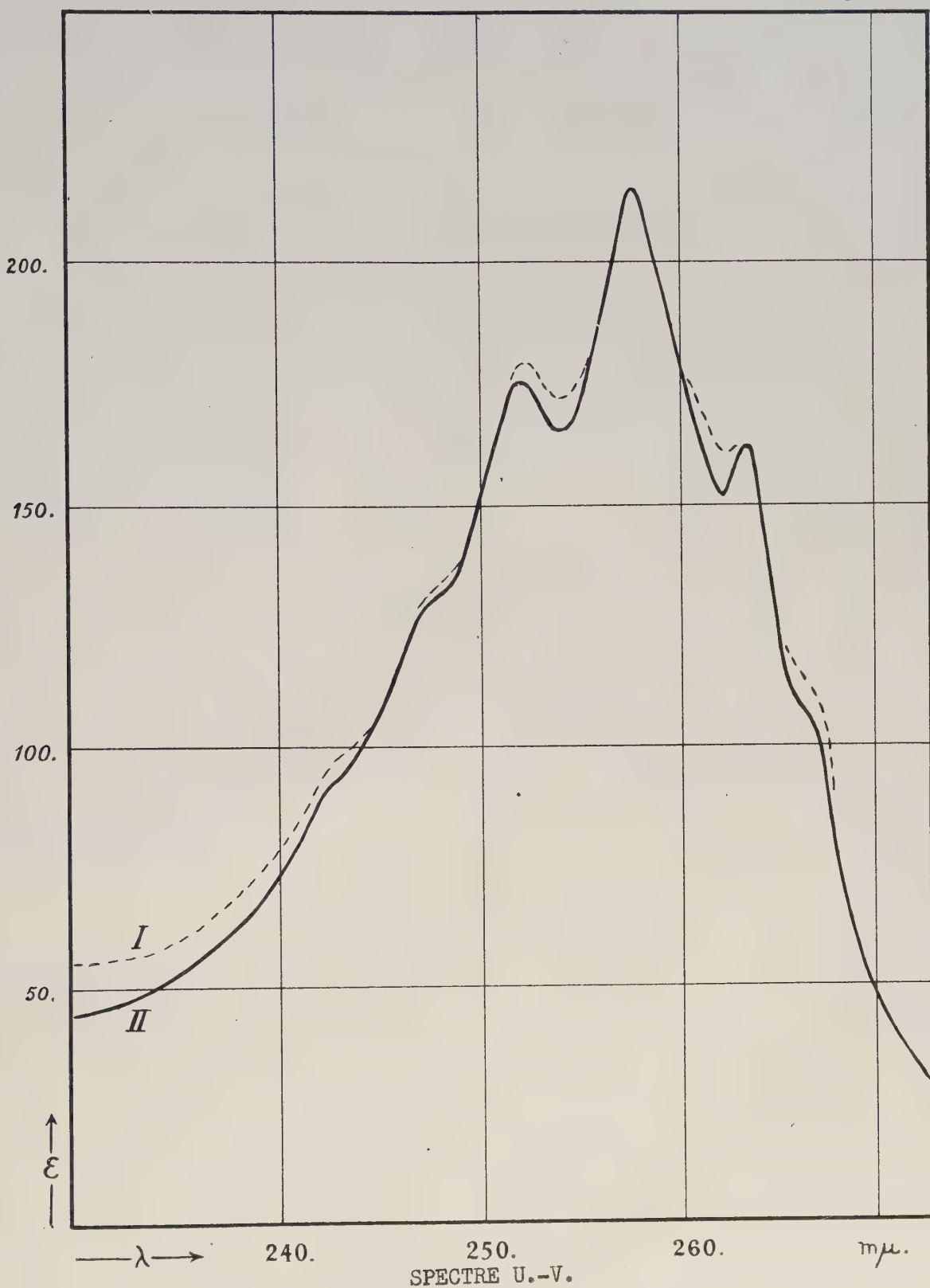
La nature de l'amino-alcool isolé de l'ovomucoïde réduit est établie par

TABLEAU VI

Position et valeur du maximum des bandes
d'absorption du Phénylalaninol

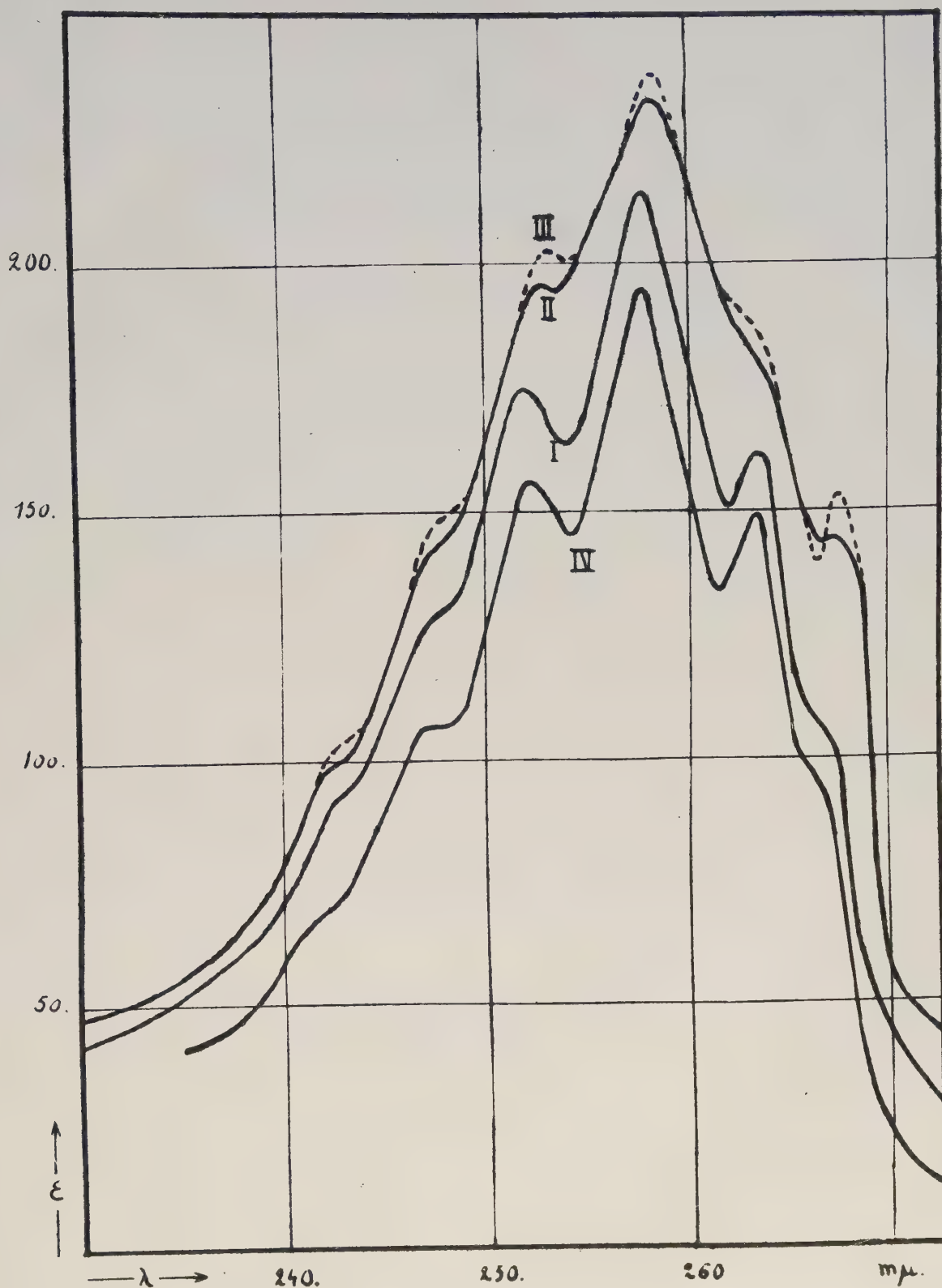
S o l v a n t	λ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-2}$
HCL 0,1 N	242	0,90
	247	1,28
	252	1,74
	257,5	2,15
	263	1,63
	266,5	1,04
H ₂ O	242	0,95
	247,5	1,45
	252,5	1,97
	258	2,35
	263,5	1,81
	267	1,44
NaOH 0,1 N	242	0,99
	247,5	1,48
	253	2,01
	258	2,39
	263,5	1,84
	267	1,52

Fig. V



I. Amino-Alcool isolé de l'ovomucoïde
II. Phénylalaninol dans HCl 0,1 N.

Fig. VII.



SPECTRE U.-V.

- I. Phénylalaninol dans HCl 0,1 N ;
- II. dans l'eau ;
- III. dans NaOH 0,1 N ;
- IV. Phénylalanine dans l'eau.

son adsorbabilité sur silice et sur charbon,
sa chromatographie sur papier dans divers solvants,
son spectre ultra-violet;
et la quantité de ce produit est déterminée par son dosage à l'aide d'acide
periodique (0,80 résidu) et la spectro-photométrie (0,82 résidu).

L'ensemble de ces résultats, qui concordent parfaitement, tant
au point de vue qualitatif que quantitatif, montre que dans la molécule d'
ovomucoïde une molécule de phénylalanine est en position C-terminale. La
différence entre le nombre expérimental (0,80-0,82) et le nombre théorique
de 1 résidu ne diminue pratiquement pas la valeur de ces conclusions.

Le processus d'isolement de l'amino-alcool, utilisé pour cette
protéine, est quantitatif; la valeur de 0,80 résidu est due à la réduction,
qui dans les conditions où nous avons opéré, et pour cette protéine, aurait
un rendement de 80 %.

Fraenkel-Conrat et Porter (105) ayant montré que l'ovomucoïde
possède un seul résidu N-terminal, l'alanine, par molécule, on peut en con-
clure que cette protéine est constituée d'une seule chaîne peptidique dont
l'extrémité aminée est formée d'alanine et l'extrémité carboxylique de
phénylalanine.

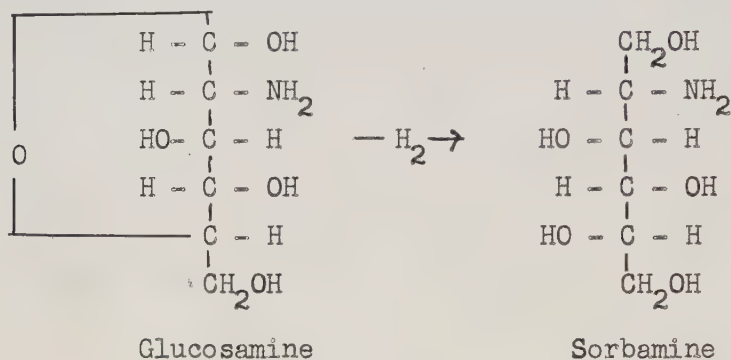
Appendice.

Action des hydrures doubles sur la glucosamine.

L'action des hydrures doubles sur les sucres et les polysaccharides a été étudiée récemment par divers auteurs qui ont observé une réduction des groupes aldéhyde et lactone avec formation d'hexitols et disparition des propriétés réductrices (106-109).

Dans le cas de la glucosamine, il se formerait par réduction, le 2-désoxy-2-amino-sorbitol ou sorbamine. Cette substance est mentionnée dans la littérature (110) mais n'a jamais été isolée. La sorbamine comme la glucosamine est basique. Elle réagit par sa fonction aminée avec la ninhydrine. La glucosamine et la sorbamine offrent par conséquent toutes deux de grandes analogies avec nos amino-alcools, en particulier en ce qui concerne leur adsorbabilité sur silice.

Réduction de la glucosamine :



Pour obtenir la sorbamine ou 2-désoxy-2-amino-sorbitol nous avons effectué la réduction de la glucosamine au moyen de l'hydrure double de bore et de sodium (110). On sait en effet que ce réducteur, actif en particulier sur les fonctions aldéhydes et lactones est stable en milieu aqueux. Il a été utilisé récemment pour réduire divers oses en les hexitols correspondants. La réduction est rapide et le rendement élevé. Après la réaction on acidifie le milieu pour détruire l'excès de réducteur. La solution ainsi obtenue nous a servi à déterminer le R_F de la sorbamine réduite dans une chromatographie sur papier utilisant comme solvant

Butanol - Acide acétique - Eau :

Glucosamine R_F 0,15

Sorbamine R_F 0,30

Les chromatogrammes faits avec l'éluat de la chromatographie sur silice, contenant la partie basique de l'ovomucoïde réduit, nous ont permis de constater la présence la glucosamine, qui non complètement détruite au cours de l'hydrolyse acide par HCl 6 N, a été retenue sur silice.

L'absence de la sorbamine dans cette fraction fait penser soit que les groupes aldéhydes de la glucosamine, contenue dans l'ovomucoïde, ne sont pas libres, soit que la sorbamine formée aurait été entièrement détruite au cours de l'hydrolyse.

RESUME.

On sait l'intérêt de connaître, dans les peptides libres et dans les protéines, les acides aminés terminaux, dont le radical aminé ou le radical carboxylique est libre (N terminaison, C terminaison). Mais alors qu'on possède une méthode pour la détermination des premiers, les seconds (C terminaison) échappaient jusqu'ici à toute méthode chimique générale de détermination. Nous avons mis au point une méthode qui consiste essentiellement à réduire les groupes carboxyliques libres en alcools primaires par l'hydrure double de lithium et d'aluminium, puis à hydrolyser complètement la protéine traitée et à isoler l'amino-alcool correspondant à l'acide aminé terminal. On caractérise cet amino-alcool par chromatographie et on en déduit la nature de l'acide aminé terminal.

Nous avons préparé synthétiquement 14 amino-alcools correspondant aux acides aminés naturels; quatre d'entre eux : thréoninol, valinol, isoleucinol et glutamidiol, n'avaient pas encore été obtenus.

Nous avons étudié la chromatographie sur silice, sur charbon et sur papier, des amino-alcools et mis au point une série de solvants permettant leur séparation dans tous les cas. Nous avons également étudié leur comportement à l'ionophorèse sur papier. Leur dosage se fait par l'acide periodique.

a) - Application à l'insuline -

Cette protéine séchée et broyée, mise en suspension dans la N éthyl-morpholine a été réduite par l'hydrure double de lithium et d'aluminium. Elle est ensuite hydrolysée; l'hydrolysat évaporé à sec, est alcalinisé et extrait à l'éther. Cet extrait étheré concentré est soumis à la chromatographie sur papier, qui permet d'identifier deux amino-alcools : la colamine et l'alaninol, correspondant respectivement au glyocolle et à l'alanine. Les dosages sont ensuite effectués au moyen de l'acide periodique, qui réagit avec les amino-alcools pour engendrer de l'ammoniac, du formol et un aldéhyde.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de dire que dans la molécule élémentaire d'insuline de poids moléculaire 12.000, deux molécules de glyocolle et deux molécules d'alanine ont leurs radicaux carboxyliques libres. Ces quatre amino-acides constituent donc les C-terminaisons des quatre chaînes peptidiques qui forment cette molécule élémentaire.

b) - Application à l'ovomucoïde -

L'application de notre méthode à cette protéine nous a permis d'identifier la phénylalanine comme amino-acide C terminal. Après la réduction, nous avons pu, cette fois, isoler et purifier la protéine réduite et nous l'avons soumise à une série de dosages : N total, N amidé, Histidine, Tyrosine.

L'isolement de l'amino-alcool a, cette fois, été effectué par chromatographie sur silice. En effet le caractère basique très prononcé des amino-alcools leur confère la propriété d'être retenus par la silice acide, d'où ils peuvent être quantitativement élués par l'acide chlorhydrique dilué. Dès lors, un hydrolysate de cette protéine réduite est chromatographié sur silice, ce qui isole une fraction basique renfermant outre les bases hexoniques, l'amino-alcool.

Nous avons passé ensuite cette fraction sur une colonne de charbon qui, comme on sait, retient les corps à caractère aromatique. Dans l'éluat de cette chromatographie se trouve le phénylalaninol que nous identifions et dosons :

- par chromatographie sur papier dans divers solvants,
- par réaction avec l'acide periodique,
- par son spectre ultra-violet.

Fraenkel-Conrat et Porter ayant montré que l'ovomucoïde possède un seul résidu N terminal d'alanine par molécule, on peut en conclure que cette protéine est constituée d'une seule chaîne peptidique dont l'extrémité aminée est formée d'alanine et l'extrémité carboxylique de phénylalanine.

BIBLIOGRAPHIE.

1. F. SANGER - Biochem. J. 32 (1945) 507.
2. P. Desnuelle - Bull. Soc. Chim. France 16 (1949) 251.
3. A. E. Finhold - A.C. Bond et H.I. Schlesinger - J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 1199.
4. R.F. Nystrom et W.G. Brown - J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 1197.
5. R.F. Nystrom et W.G. Brown - J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 2548.
6. R.F. Nystrom et W.G. Brown - J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 3738.
7. S. Fox - Adv. in Prot. Chem. 2 (1945) 156.
8. W. Grassman, H. Dyckerhof et H. Eiheler - Z. Physiol. Chem. 189 (1930) 112.
9. E. Waldschmidt-Leitz, F. Ziegler, A. Schäffner et L. Weil - Z. Physiol. Chem. 197 (1931) 219.
10. J. Lens - Biochim. Biophys. Acta 3 (1949) 367.
11. J. S. Fruton - Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 9 (1941) 211.
12. H.D. Dakin - J. Biol. Chem. 13 (1912) 357.
13. W.M. Cahill et L.F. Burton - J. Biol. Chem. 132 (1940) 161.
14. L.J. Harris - Proc. Roy. Soc. (London) B 95 (1923) 440.
15. H.S. Simms - J. Gen. Physiol. 11 (1927) 629.
16. N.W. Pirie et K.G. Pinkey - J. Biol. Chem. 84 (1929) 321.
17. F. Bettziecke - Z. Physiol. Chem. 161 (1926) 37 et 178.
18. P. Schlack et W. Kumpf - Z. Physiol. Chem. 154 (1926) 125.
19. J. Tibbs - Nature 168 (1951) 910.
20. E. Abderhalden et H. Brockmann - Biochem. Z. 225 (1930) 386.
21. M. Bergman et L. Zervas - J. Biol. Chem. 113 (1936) 341.
22. E. Pacsu et E.J. Wilson - J. org. Chem. 7 (1942) 117.
23. N. Lichtenstein, S. Hestrin, E. Dimant et H. Brzoza - J. Am. Chem. Soc. 60 (1938) 560.
24. P. Karrer, P. Portman et M. Suter - Helv. 31 (1948) 1617.
25. P. Karrer, M. Suter et P. Waser - Helv. 32 (1949) 1936.
26. P. Karrer et P. Portman - Helv. 32 (1949) 1034.
27. A. Stoll, J. Peyer et A. Hofman - Helv. 26 (1944) 923.
28. P. Karrer, W. Karrer, H. Thomann, E. Horlacker et W. Mäder - Helv. 4 (1921) 76.
29. P. Karrer; M. Gisler, E. Horlacker, F. Locker, W. Mäder et H. Thomann - Helv. 5 (1922) 469.
30. U. Solms - Chimia 5 (1951) 25.
31. W. G. Brown - Org. Reactions VI (1951) 469.
32. L. W. Trevoy et W. G. Brown - J. Am. Chem. Soc. 70 (1949) 1675.
33. J. E. Johnson - J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 3664.
34. J. Mahé, J. Rollet et A. Willemart - Bull. Soc. Chim. France 16 (1949) 481.

35. Th. Curtius - Ber. 16 (1883) 753.
36. E. Fischer - Ber. 34 (1901) 433.
37. P.A. Levene - J. Biol. Chem. 6 (1909) 419.
38. E. Abderhalden - Z. Physiol. Chem. 120 (1922) 208.
39. M. Fränkel - J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 2266.
40. P. Karrer et G. Aman - Helv. 32 (1950) 302.
41. P. Jolles et Cl. Fromageot - Bull. Soc. Chim. France 18 (1951) 862.
42. K. Heyns et W. Walter - Hoppe-Seyl. Z. 287 (1951) 15.
43. G. Bearts - Nature 162 (1949) 651.
44. E. Chargaff, C. Levine et C.H. Green - J. Biol. Chem. 175 (1948) 67.
45. R. Acher, Cl. Fromageot et M. Jutisz - Biochim. Biophys. Acta 5 (1950) 81.
46. C. E. Dent et H. R. Grumpler - Nature 164 (1949) 442.
47. Cl. Fromageot, M. Jutisz et E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta, 2 (1948) 487.
48. W. C. Bauman, J. Eichhorn - J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 2830.
49. S. M. Partridge et R. G. Westall - Biochem. J. 44 (1949) 418.
50. S. M. Partridge et R. C. Brimley - Biochem. J. 44 (1949) 513 et 521.
51. S. M. Partridge - Biochem. J. 45 (1949) 459.
52. A. H. Gordon, B. Keil, K. Sebesta, O. Knessl et F. Sorn - Coll. Trav. Chim. Tcheosl. 15 (1950) 1.
53. H. D. Cremer et A. Tiselius - Biochem. Z. 320 (1950) 273.
54. H. J. McDonald, M.C. Urbin et M. B. Williamson - J. Coll. Sc. 6 (1951) 236.
55. E. L. Durrum - J. Am. Chem. Soc. 72 (1950) 2943.
56. E. L. Durrum - Science 113 (1951) 66.
57. A. C. Chibnall, M.W. Rees et E. F. Williams - Biochem. J. 37 (1943) 354.
58. J. Lens - Biochem. Biophys. Acta 2 (1948) 76.
59. K. Freudenberg et H. Eyer - Z. physiol. Chem. 213 (1932) 226.
60. K. Freudenberg - Z. physiol. Chem. 233 (1935) 159.
61. K. Freudenberg - Z. physiol. Chem. 263 (1940) 1.
62. V. du Vigneaud - J. Biol. Chem. 94 (1931) 233.
63. O. Wintersteiner - J. Biol. Chem. 102 (1933) 473.
64. E. D. Shock, H. Jensen et L. Hellerman - J. Biol. Chem. 111 (1935) 553.
65. N. R. Blatherwick, F. Bischoff, L.C. Maxwell, J. Berger et N. Sahyun - J. Biol. Chem. 72 (1927) 57.
66. K. G. Stern et A. White - J. Biol. Chem. 117 (1937) 95.
67. K. G. Stern et A. White - J. Biol. Chem. 119 (1937) 215.
68. J. Strating et H.J. Baker - Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 69 (1950) 638 et 909.
69. L. Malaprade - C.R. 186 (1928) 382.
70. P. Fleury et J. Lange - C.R. 195 (1932) 1395.
71. P. Fleury et R. Paris - C.R. 196 (1933) 1416.

72. J. Courtois - Exposés Ann. Biochim. Méd. 2 (1948) 225.
73. P. Fleury et S. Boisson - C.R. 204 (1937) 1264.
74. P. Fleury et J. Courtois - C.R. 209 (1939) 219.
75. P. Fleury, J. Courtois et M. Grandchamp - Bull. Soc. Chim. France - (1949) 88.
76. P. Fleury, J. Courtois et M. Grandchamp - Biochim. Biophys. Acta 3 (1949) 336.
77. L. A. Shinn et B. H. Nicolet - J. Am. Chem. Soc. 61 (1939) 1615.
78. L. A. Shinn et B. H. Nicolet - J. Biol. Chem. 138 (1941) 91.
79. L. A. Shinn et B. H. Nicolet - J. Biol. Chem. 139 (1941) 687.
80. L. A. Shinn et B. H. Nicolet - J. Biol. Chem. 142 (1942) 139.
81. E. L. Jackson - Organ. reactions (1941) 341.
82. D. D. Van Slyke, A. Hiller et D. McFadyen - J. Biol. Chem. 141 (1941) 681.
83. A.J.P. Martin, et R.L.M. Synge - Biochem. J. 35 (1941) 294.
84. Th. Winnick - J. Biol. Chem. 141 (1941) 115.
85. Th. Winnick - J. Biol. Chem. 142 (1942) 451.
86. Th. Winnick - J. Biol. Chem. 142 (1942) 461.
87. W.N.M. Ramsay et C.P. Stewart - Biochem. J. 35 (1941) 39.
88. J. H. Jones - J. Am. Off. Agr. Chem. 27 (1944) 463.
89. A. C. Chibnall - J. Intern. Soc. Leather Trades' Chemists 30 (1946) 1.
90. H. Gutfreund - Biochem. J. 42 (1948) 156.
91. F. Sanger - Biochem. J. 44 (1949) 126.
92. F. Sanger - Nature 160 (1947) 295.
93. F. Sanger - Nature 162 (1948) 491.
94. F. Sanger et A. Tiselius - Nature 160 (1947) 433.
95. A. C. Chibnall et M. W. Rees - Biochem. J. 48 (1951) xlvii
96. Cl. Fromageot, M. Jutisz, D.M. Meyer et L. Pénasse - C.R. 230 (1950) 1905.
97. Cl. Fromageot, M. Jutisz, D.M. Meyer et L. Pénasse - Biochim. Biophys. Acta 6 (1950) 283.
98. H. L. Fevold - Adv. Protein Chem. VI (1951) 190.
99. M. Stacey et J. M. Woolley - J. Chem. Soc. (London) 1940, 184.
100. M. Stacey et J. M. Woolley - J. Chem. Soc. (London) 1942, 550.
101. H. Lineweaver et C.W. Murray - J. Biol. Chem. 171 (1947) 565.
102. E. Fredericq et H. F. Deutsch - J. Biol. Chem. 181 (1949) 499.
103. J. C. Lewis, N. S. Snell, D. J. Hirschmann et H. Fraenkel - Conrat J. Biol. Chem. 186 (1950) 23.
104. E. G. Young - Nature 145 (1940) 1021.
105. H. Fraenkel-Conrat et R.R. Porter - Biochem. J. 49 (1951) lxxviii.
106. R. K. Ness, H.G. Fletcher et C.S. Hudson - J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) 4759.
107. M. Abdel-Akher et F. Smith - Nature 166 (1950) 1037.
108. B. Lythgoe et S. Trippett - J. Chem. Soc. (London) 1950, 1983.

- 109. M. Abdel-Akher, J.K.Hamilton et F. Smith - J. Am. Chem. Soc. 73
(1951) 4691.
 - 110. V. G. Bashford - Nature 165 (1950) 566.
 - 111. H. T. McPherson - Biochem. J. 36 (1942) 59.
 - 112. R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin et R.L.M. Synge - Biochem. J.
41 (1947) 590.
 - 113. R. Acher, M. Jutisz et Cl. Fromageot - Biochem. Biophys. Acta 8
(1952) (sous presse).
 - 114. E. J. Conway et E. O'Malley - Biochem. J. 36 (1942) 655.
 - 115. Handbook Chem. and Phys. - Rubber Publ. Co., Cleveland, 30th Ed. 1345.
 - 116. Cl. Fromageot et G. Schnek - Biochim. Biophys. Acta 6 (1950) 113.
 - 117. Fajans, dans G. Charlot et D. Bézier : Méthodes Modernes, (1945) 105.
 - 118. G. R. Tristram - Adv. Prot. Chem. 5 (1949) 99.
 - 119. A. R. Thompson - Nature 169 (1952) 495.
-

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION	1
<u>Première Partie : Historique des Travaux antérieurs</u>	3
A. Méthodes enzymatiques	3
B. Méthodes physicochimiques	3
C. Méthodes chimiques	3
<u>Deuxième Partie : Les Amino-alcools</u>	7
1. Préparation des Amino-alcools	7
A - Théorie de la réduction	7
B - Estérification	9
C - Régénération	9
D - Technique de la réduction	10
2. Propriétés des Amino-alcools	10
3. Isolement et caractérisation des Amino-Alcools	12
A - Extraction à l'éther	12
B - Chromatographie sur silice	12
C - Chromatographie sur charbon	13
D - Chromatographie sur papier	13
E - Ionophorèse sur papier	15
4. Détermination quantitative des Amino-alcools	16
A - Dosage par l'acide periodique	16
B - Absorption en ultra-violet	17
<u>Troisième Partie : Application aux Protéines</u>	18
Généralités	18
1. <u>Insuline</u>	19
A - Réduction de la Protéine	19
B - Isolement des Amino-Alcools par extraction à l'éther ...	21
C - Etude qualitative par chromatographie sur papier	22
D - Etude quantitative	23
E - Interprétation des résultats	25
2. <u>Ovomucoïde</u>	26
A - Réduction et Isolement de la protéine réduite	26
B - Séparation et Identification des Amino-alcools	28
a) Chromatographie sur silice	28
b) Chromatographie sur charbon	29
C - Déterminations quantitatives	30
a) Dosage par l'acide periodique	30
b) Spectre d'absorption en ultra-violet	31
D - Interprétation des Résultats et Conclusions	31
<u>Appendice : Action des hydrures doubles sur la glucosamine</u>	34
RESUME	35
BIBLIOGRAPHIE	37

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Détermination de la Lysine N-terminale et totale du Lysozyme.

Vu et approuvé :

PARIS, le 24 Avril 1952.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

(s.) A. CHATELET.

Vu
et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

(s.) Jean SARRAILH.

